

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES
D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNEE 1970-1971

Série E.N° 226

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Michel BAUDRY

Titre de la thèse :

Influence de l'état thyroïdien sur les oxydations
phosphorylantes mitochondriales et sur la biosynthèse
des protéines subcellulaires chez le rat et la souris
génétiquement naine.

soutenue le 7 Juin 1971

JURY	MM. MICHEL R.	Président
	COHEN Y.	
	AGNERAY J.	Examineurs
	VOLFIN P.	

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES

D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNEE 1970-1971

Série E.N° 226

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Michel BAUDRY

Titre de la thèse :

Influence de l'état thyroïdien sur les oxydations
phosphorylantes mitochondriales et sur la biosynthèse
des protéines subcellulaires chez le rat et la souris
génétiquement naine.

soutenue le 7 Juin 1971

JURY

MM.MICHEL R.

Président

COHEN Y.

AGNERAY J.

Examineurs

VOLFIN P.

UNIVERSITE REINE DESCHERES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES

DIVISION DES SCIENCES ET DES LETTRES

SAISON 1970-1971

ANNEE 1970-1971

THESE

ETAT-1971

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES
DE L'UNIVERSITE REINE DESCHERES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(SPECIALITE: TOXICOLOGIE)

par

MICHEL BAUDRY

Le 12 Juin 1971

Intégration de l'état de l'art des connaissances
pharmacologiques et toxicologiques de la pharmacologie
des médicaments et des toxiques et de la toxicologie
pharmacologique.



Approuvé le 7 Juin 1971

Président

M. MICHEL B.

1971

Conseil

Examinateur

M. AGNEAU J.

1971

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été réalisées au Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée du Collège de France. Qu'il me soit permis d'exprimer à M. le Recteur Jean ROCHE toute ma reconnaissance pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire.

Qu'il me soit également permis de remercier M. le Professeur MICHEL de m'avoir confié ce travail et patiemment dirigé au cours de mes recherches.

Je veux aussi remercier:

- Madame Odette MICHEL pour tous les conseils et toute l'aide qu'elle m'a prodigués au cours de ce travail.
- M. le Professeur COHEN
- M. le Professeur AGNERAY
- M. le Docteur VOLFIN, Maître de Recherches au CNRS de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Ma gratitude s'adresse encore à tous ceux qui m'ont aidé au cours de ce travail:

- tous mes collègues et amis du Collège de France et du Laboratoire d'Endocrinologie de la Faculté de Pharmacie.

I N T R O D U C T I O N

=====

L'hypophysectomie provoque un ralentissement des fonctions essentielles de l'organisme. Les troubles observés procèdent de la suppression des sécrétions glandulaires avec pour conséquence une diminution de l'activité métabolique générale. Ce contrôle la glande pituitaire l'exerce par les hormones provenant d'une part de l'adénohypophyse et d'autre part de la neurohypophyse. Les neuro-sécrétions de cette dernière, l'hormone antidiurétique et l'ocytocine, agissent de façon spécifique sur des territoires bien définis puisque l'ADH règle l'excrétion hydrique au niveau rénal et que l'ocytocine est un puissant stimulant utérin.

Parmi les sécrétions adénohypophysaires on distingue généralement deux types d'hormones suivant qu'elles transmettent leur message chimique directement ou par l'intermédiaire d'une glande cible. L'hormone somatotrope (STH) est le représentant de la première catégorie. Elle est essentielle à une croissance et un développement normal. Aussi l'effet le plus remarquable de l'hypophysectomie, lorsqu'elle est pratiquée sur de jeunes animaux sera le ralentissement de la croissance. Cette déficience est généralement imputée à l'absence de sécrétion de la seule STH. En fait l'hypophysectomie entraîne également une insuffisance thyroïdienne consécutive au défaut de thyroïdostimuline hypophysaire (TSH), messenger hormonal du deuxième type, puisque manifestant ses effets par l'intermédiaire d'une glande cible. Or l'hypothyroïdie provoque également un ralentissement de la croissance et du développement qui peut être corrigé par injection de thyroxine en présence de STH.

L'administration d'hormones thyroïdiennes à l'animal hypophysectomisé par contre ne restaure pas la croissance. Nous voyons donc que la STH et les iodothyronines sont impliquées dans les mécanismes régulateurs de la synthèse et de la différenciation protéique.

La croissance envisagée au niveau cellulaire se manifeste par l'anabolisme des protéines et la division cellulaire (1). Il est maintenant bien établi que ces hormones influencent l'activité biosynthétique protéique de leur cellule cible (2)(3)(4), mais on ne peut encore préciser comment cette régulation de la synthèse protéique est réalisée. Bien que l'on ait mis en évidence, tant avec STH qu'avec les phénols iodés, des effets qualitatifs et quantitatifs au niveau des différentes étapes impliquées dans le métabolisme protéique, on est encore incapable de dire quel stade du processus est le site primaire d'action de ces hormones, s'il est le même pour les deux types de sécrétion et si les effets ne sont pas la conséquence d'une action menée au niveau d'une autre sphère métabolique.

Ce dernier point prend toute sa signification lorsque l'on considère les hormones thyroïdiennes. Ces substances possèdent en effet des propriétés multiples qui peuvent être classées en deux catégories principales: d'une part celles qui sont en relation avec la croissance et le développement et que nous avons déjà mentionnées, et d'autre part celles qui règlent l'activité métabolique. Les premières traduisent le rôle sur la biosynthèse des protéines (5), les secondes caractérisent surtout l'influence sur les oxydophosphorylations mitochondriales (6). En effet des doses d'hormones thyroïdiennes qui activent la croissance augmentent simultanément le métabolisme basal (7)(8). On peut se demander dans quelle mesure ces deux phénomènes dépendent l'un de l'autre. Envisagés au niveau subcellulaire, ils peuvent être considérés comme résultant d'une action hormonale qui se manifesterait soit indépendamment sur le noyau pour l'un et sur la mitochondrie pour l'autre, soit essentiellement au niveau nucléaire l'influence sur la mitochondrie en étant en quelque sorte une conséquence. Dans ce dernier cas l'augmentation de la

capacité respiratoire des mitochondries procéderait d'une synthèse accrue des ensembles multienzymatiques qui interviennent dans les réactions d'oxydophosphorylation. Au niveau de la mitochondrie se manifestent des effets dûs à l'action hormonale. Il est donc intéressant de préciser quelles sont les données actuelles concernant les composants et les structures de l'organe impliqué dans le métabolisme oxydatif.

Les mitochondries sont des granulations de 1 à 5 μ de longueur formées d'un système à double membrane délimitant une matrice. Ces deux membranes diffèrent par leurs propriétés et leur composition (9)(10). Elles ne sont pas seulement des enveloppes inertes, mais contiennent des ensembles d'enzymes caractéristiques fortement structurés. La paroi externe n'est pas douée de perméabilité sélective, elle permet le passage de toutes les petites molécules définissant ainsi un espace perméable non spécifique dans la mitochondrie (11)(12). La membrane interne se comporte différemment et est douée de perméabilité spécifique (13)(14).

L'analyse chimique a montré que les mitochondries contiennent outre divers sels minéraux, des composés lipidiques (35%) et des constituants protéiques (65%)(15). Parmi les protéines mitochondriales on distingue d'une part des dérivés solubles et extractibles, d'autre part des composants insolubles comprenant les protéines structurales et les ensembles enzymatiques liés aux membranes. On peut donc obtenir à partir de mitochondries isolées différentes fractions protéiques qui constituent des entités biochimiques assez bien définies. Les protéines solubles sont surtout d'origine matricielle, elles comprennent principalement les enzymes du cycle tricarboxylique de KREBS. Les déshydrogénases malique, B-hydroxybutyrique et glutamique ont été caractérisées dans cette fraction (16)(17). Le cytochrome c est un produit soluble faiblement lié aux éléments structuraux et facilement extractible au moyen d'une solution KCl diluée (18). De plus comme d'une part le Mg, Pi et les hormones thyroïdiennes provoquent l'hypertrophie mitochondriale, et que d'autre part

l'ATP chasse l'eau fixée (19)(20), on a supposé que ce phénomène se manifestait grâce à l'existence d'une protéine contractile semblable à l'actomyosine du muscle. On est parvenu à l'isoler par une solution KCl 0,6M (21)(22). Néanmoins la nature de cette protéine est fortement controversée (23).

La protéine structurale constitue un des éléments de la fraction insoluble. Son homogénéité a été établie par ultracentrifugation et analyse électrophorétique après isolement. La protéine structurale forme à pH7 un agrégat insoluble de polymères, mais à pH11 ou en présence de détergents anioniques une forme monomère a pu être solubilisée (24). Les cytochromes a, b et c₁ possèdent des propriétés physiques et chimiques analogues. La protéine structurale forme des complexes avec les cytochromes dont la mise en évidence semble démontrée. Ces composants cytochromiques sont fortement liés aux éléments structuraux des membranes.

La séparation des membranes et des différents constituants a permis d'aborder l'étude de la biosynthèse des mitochondries lesquelles disposent d'une certaine autonomie biochimique. C'est ainsi qu'elles sont en mesure d'effectuer la synthèse des acides nucléiques et des protéines grâce à un équipement macromoléculaire qui leur est propre (25). L'existence de l'ADN et de divers types d'ARN mitochondriaux est maintenant bien établie (26)(27)(28)(29). L'ADN de mitochondries hépatiques de rat se réplique suivant un modèle semi-conservatif. L'isolement et la purification d'une ADN-polymérase mitochondriale est en faveur d'un mécanisme indépendant de synthèse de l'ADN dans la mitochondrie (30). Il convient de remarquer que la quantité d'ADN que renferme les mitochondries est insuffisante pour contrôler la biosynthèse de toutes leurs protéines (31).

Une telle observation implique une double origine biogénétique des constituants mitochondriaux. Les particules isolées fixent les acides aminés de préférence dans une fraction insoluble liée aux membranes (5)(32). NEUPERT (33) et BEATTIE (34) ont montré que la membrane interne seule est alors le site d'incorporation.

Il y a donc un transfert de protéines préformées d'un site cytoplasmique vers les structures de l'organelle (35)(36)(37)(38).

L'autonomie biochimique est donc incomplète aussi, envisagée sous l'angle biosynthétique et biogénétique, elle intéresse une partie seulement de la mitochondrie. L'hétérogénéité des vitesses de renouvellement de divers composants protéiques mitochondriaux illustre assez bien ce fait. En effet si de nombreux éléments protéiques semblent se renouveler avec des vitesses voisines (39)(40)(41) et semblables à celle de l'ADN mitochondrial (42), certaines enzymes telles que l'alanine aminotransférase, l'ornithine aminotransférase (43) et la d-aminolévulinate synthétase (44) ont des demi-vies inférieures à un jour. L'étude des vitesses de renouvellement des membranes mitochondriales par deux approches expérimentales différentes a révélé que la membrane interne se renouvelle plus lentement que la paroi externe (45)(46)

L'équipement macromoléculaire sur lequel les hormones exercent un effet après une période de latence assez longue peut-il constituer le site primaire de l'action hormonale ? Une réponse plus précoce sur la respiration mitochondriale a été observée après administration d'hormones thyroïdiennes à des rats thyroïdectomisés (47). Une hypothèse fut émise selon laquelle l'activité initiale des iodothyronines se manifeste sur le fonctionnement de l'organite avant toute activation de la biosynthèse protéique. Les différentes études entreprises pour tenter de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses ont conduit à des résultats souvent contradictoires. C'est ainsi que SOKOLOF (48) admet que le site de l'action spécifique des hormones iodées est la mitochondrie elle-même qui serait nécessaire à une stimulation de la synthèse protéique au niveau de la traduction, les effets au stade de la transcription n'étant que secondaires. Cette conclusion est en opposition totale avec une action primaire sur la synthèse des ARN (49).

L'incorporation de la L-leucine ^{14}C dans les protéines mitochondriales (50) et microsomales (51) semble augmenter quand on ajoute la triiodo-L-thyronine (T_3) et la thyroxine (T_4) au milieu d'incubation. Cependant TATA n'a jamais obtenu d'effets directs de ces hormones in vitro, mais comme les conditions opératoires utilisées par ces différents chercheurs sont très différentes, il n'est pas possible de comparer valablement leurs résultats.

BUCHANAN constatant que les sécrétions thyroïdiennes provoquent à la fois le gonflement mitochondrial et une activation de la synthèse protéique, a tenté de relier ces deux phénomènes et il conclut que ces hormones amènent des modifications structurales qui sont responsables de la stimulation de la synthèse protéique (52). Enfin on a montré que l'incorporation de la L-leucine dans les protéines mitochondriales de souris injectées de T_3 précédait nettement l'incorporation dans les protéines microsomales (53). Cette stimulation précoce de la synthèse protéique est à rapprocher des travaux de VOLFIN (54) concernant un effet rapide de la thyroxine sur le marquage des protéines mitochondriales solubles, accompagné d'une activation de la respiration dans l'état 4.

Bien que l'analyse de tous ces résultats ne permette pas d'apporter des conclusions définitives sur les mécanismes moléculaires des hormones thyroïdiennes, une action plus marquée semble se manifester au niveau mitochondrial que l'on considère ou non que le contrôle hormonal passe par l'intermédiaire d'un processus biosynthétique.

On a étudié ce problème en administrant à l'animal des doses variables d'iodothyronines, mais aucune réponse n'est jusqu'ici satisfaisante car les résultats dépendent de la quantité d'hormone utilisée. De plus l'exploration du métabolisme protéique nécessite le maintien d'un état d'équilibre dynamique, condition qu'il est difficile d'atteindre lorsque l'on soumet l'animal à des injections répétées de T_3 ou de T_4 (55). On élimine de tels inconvénients en comparant les phénomènes biologiques chez le rat normal et thyroïdectomisé avec hypothyroïdie installée.

La biosynthèse des protéines actives dépend non seulement des iodothyronines, mais aussi de l'hormone de croissance (STH) comme nous l'avons déjà signalé. Il est en effet bien établi que STH stimule la croissance et la synthèse des ARN et des protéines de nombreux tissus (56)(57). Il est certain que ces deux types d'hormones ont des actions complémentaires, la caractérisation des propriétés de chacune nécessite un matériel biologique approprié. Les modifications morphologiques que présente une souche de souris atteinte d'un nanisme héréditaire récessif obéissant aux lois de Mendel sont à cet égard significatives. Cet animal possède une hypophyse qui à l'examen histologique semble privée de cellules éosinophiles responsables de la sécrétion de STH. De plus on observe une diminution importante des cellules thyroïotropes, la glande thyroïde ainsi privée de sa stimuline hypophysaire est très réduite et riche en tissu conjonctif. Par contre les sécrétions d'ACTH et d'hormones gonadotropes, bien que plus faibles existent et la neurohypophyse fonctionne normalement. Cet animal constitue un matériel de choix pour étudier l'influence des hormones thyroïdiennes en présence ou non de l'hormone de croissance. Il présente l'avantage sur l'animal hypophysectomisé de conserver une sécrétion presque normale de la plupart des stimulines et des hormones neurohypophysaires.

Nous avons donc estimé qu'il convenait de préciser à l'aide de ce matériel biologique les rapports existant entre les effets des hormones impliquées dans la croissance tant sur le fonctionnement que sur la structure mitochondriale, après avoir tenté de caractériser l'action des hormones iodées endogènes sur les réactions d'oxydophosphorylation et sur la biosynthèse des protéines.

O B J E T D U T R A V A I L
=====

Notre travail comportera trois parties:

- La première est consacrée à la description du matériel et des techniques générales utilisées.
- La seconde qui comprendra deux chapitres relate les expériences réalisées chez le rat normal et thyroïdectomisé.

Dans le premier chapitre est abordée une étude comparative des propriétés biochimiques des mitochondries.

Le second a pour objet l'influence de l'état thyroïdien sur la biosynthèse des constituants protéiques subcellulaires et principalement mitochondriaux.

L'apport de nos résultats à l'étude de la biogénèse mitochondriale sera évoqué.

- La troisième partie enfin rend compte des études menées chez la souris naine ayant reçu ou non des hormones. Les corrélations endocriniennes sont envisagées sur le fonctionnement mitochondrial d'une part, sur la biosynthèse des constituants protéiques subcellulaires de l'autre.

P R E M I E R E P A R T I E =====

MATERIEL ET TECHNIQUES GENERALES

Notre travail a été réalisé avec des particules subcellulaires de différents organes provenant de rats et de souris naines (dw). Les techniques expérimentales mettent en oeuvre principalement l'ultracentrifugation différentielle, la spectrophotométrie et une méthode polarographique pour déterminer la consommation d'oxygène (58)(59).

I - Préparation et qualités des particules subcellulaires de rats

Les organites sont préparés par les méthodes classiques de centrifugation différentielle de l'homogénat tissulaire. Le degré de pureté des fractions subcellulaires ainsi isolées est testé par la détermination de l'activité des enzymes marqueurs spécifiques.

1- Isolement des mitochondries hépatiques

Nous avons retenu deux méthodes de préparation des mitochondries hépatiques. Le premier plus rapide permet d'obtenir des particules dont les qualités biochimiques sont demeurées intactes, le second d'isoler des organites plus purs.

a - Dans certains essais nous avons préparé les mitochondries par la méthode de SCHNEIDER et HOGEBROOM (60) partiellement modifiée (61). Elle consiste à préparer un homogénat tissulaire

dans une solution de saccharose 0,25M réfrigérée de façon à éviter l'autolyse du tissu ainsi que toute modification cellulaire ou subcellulaire (homogénéiseur type Potter à piston de téflon entraîné par un moteur tournant à 700 tours par minute). Une première centrifugation à 650g pendant 10 minutes permet d'éliminer la fraction nucléaire et les débris cellulaires. Le surnageant décanté est ensuite centrifugé à 12000g pendant 10 minutes. Des précautions sont prises pour éliminer les lipides de la préparation. Enfin deux lavages du culot mitochondrial sont effectués et les suspensions obtenues sont centrifugées à 12000g pendant 10 minutes.

Toutes ces opérations sont faites à une température ne dépassant pas +2°C. La préparation qui est réalisée en l'absence d'EDTA, doit être utilisée dans les deux heures, passé ce délai les réactions de phosphorylations sont moins actives et des propriétés ATPasiques se manifestent.

b - Une seconde méthode de préparation des mitochondries hépatiques nous a permis d'obtenir des suspensions mitochondriales présentant moins de 3,5% de contamination microsomale (62). Sa caractéristique principale est une diminution de l'intervalle des vitesses de centrifugation dans lequel les mitochondries sont isolées.

L'homogénat est préparé avec une solution de saccharose 0,25M ajustée à pH 7,4 avec du TRIS 1mM. Ce milieu sert également aux lavages. Les foies rapidement prélevés sont immédiatement immergés dans la solution de saccharose 0,25M. Le tissu est ensuite émincé et abondamment lavé. L'homogénéisation est faite dans les proportions de 9 volumes de saccharose-TRIS pour 1 volume de tissu au Potter à piston de téflon tournant à 700 tours par minute. L'homogénat est centrifugé à 750g pendant 10 minutes. Le culot est éliminé et le surnageant centrifugé à nouveau à 750g pendant 10 minutes. La partie supérieure seule du surnageant est prélevée à l'aide d'une pipette à boule et est centrifugée à 8.700g pendant 10 minutes. Le culot est ensuite

lavé 4 fois dans le quart du volume initial de saccharose et centrifugé à 7.700g pendant 10 minutes. A chaque lavage les parois du tube sont essuyées afin d'enlever les lipides et la surface du culot est soigneusement rincée afin d'éliminer la couche légère susceptible de retenir des éléments du réticulum endoplasmique, des lysosomes et des mitochondries dégradées. Le culot est homogénéisé au Potter et à la main dans un volume de saccharose 0,25M tel que la concentration en protéines mitochondriales soit d'environ 40mg par ml.

2-Isolement des mitochondries rénales

La préparation des mitochondries rénales procède des mêmes méthodes que celles utilisées pour l'obtention des particules hépatiques. Nous les avons séparées soit par la méthode de SCHNEIDER et HOGEBROOM (60), soit par celle de BEATTIE (62) selon les essais à réaliser.

Le prélèvement de l'organe nécessite cependant un certain nombre de manipulations et certaines précautions. Les reins sont dégagés de leur capsule fibro-adipeuse *in situ* et avant la section du pédicule. Ils sont ensuite ouverts longitudinalement et la partie médullaire est éliminée. Ces dernières opérations sont réalisées sur une surface froide. Les homogénats sont alors préparés dans les mêmes conditions que pour le foie. Seul le nombre des lavages auxquels sont soumises les mitochondries pourra varier en fonction du degré de pureté désiré. La quantité de tissu de départ étant faible le culot mitochondrial obtenu est peu volumineux; aussi la quantité de saccharose dans laquelle les mitochondries sont mises en suspension ne devra pas dépasser 1 ml pour une préparation obtenue à partir des organes de trois rats.

3-Isolement des mitochondries cardiaques (63)

Cette préparation est effectuée dans des conditions de température très strictes. Aussi le milieu d'isolement et le matériel seront maintenus plusieurs heures avant l'expérience à une température de -4°C.

Les organes sont prélevés à partir d'animaux sacrifiés par section des carotides et bien saignés. Ce dernier point est particulièrement important. Les cavités sont ouvertes et, afin d'éliminer le sang encore retenu, leurs faces internes sont soigneusement appliquées sur un papier filtre, lui-même déposé sur une surface froide. Les conditions décrites par la suite sont celles nécessaires à la préparation de mitochondries provenant de deux coeurs de rats. Les organes sont rapidement plongés dans un milieu (pH 7,2) qui a la composition suivante: saccharose 0,3M, triéthanolamine, HCl 20mM, EDTA 2mM. Les tissus émincés et lavés 3 à 4 fois sont repris dans 5 ml du milieu d'isolement contenant 1mg de protéinase bactérienne cristallisée "Novo". L'ensemble est homogénéisé dans un Potter par 3 passages du piston dans un intervalle de temps n'excédant pas 30 secondes. L'homogénat est ensuite maintenu au repos pendant 10 minutes à 0°C. Durant cette période l'enzyme ajoutée exerce son action protéolytique sur le tissu fibreux cardiaque. On répète ensuite l'homogénéisation. L'homogénat est alors dilué à 40 ml avec le milieu d'isolement. Une première centrifugation de 10 minutes à 300g permet de récupérer un surnageant privé des débris cellulaires et des noyaux. Celui-ci est centrifugé à 5000g pendant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans le même volume du milieu d'isolement. Cette suspension est centrifugée dans les mêmes conditions. Le dernier culot contenant les mitochondries est repris dans un volume du milieu ne dépassant pas 0,50ml.

4-Isolement des microsomes hépatiques et rénaux (64)

Les conditions de préparation de l'homogénat sont celles retenues pour l'isolement des mitochondries. Une première centrifugation à 650g pendant 10 minutes provoque une sédimentation de la fraction nucléaire et des débris cellulaires. Le surnageant décanté est ensuite centrifugé à 12000g pendant 10 minutes. Le culot contenant la fraction mitochondriale est éliminé. Le surnageant résultant est centrifugé à 30.000g pendant

20 minutes. Les mitochondries légères qui auraient été entraînées sédimentent alors. La fraction surnageant ainsi obtenue est centrifugée à 105.000g pendant 1 heure dans une ultracentrifugeuse BECKMAN-SPINCO, modèle L-rotor 40. Le surnageant constitue le "cell sap". Après avoir éliminé les lipides adhérant aux parois du tube, le culot est repris dans le saccharose 0,25M et la suspension est centrifugée à 105.000g pendant 1 heure.

Le dernier culot est remis en suspension dans un faible volume de saccharose 0,25M et est homogénéisé au Potter et à la main. La préparation finale contient environ 10mg de protéines microsomaux par ml.

5-Isolément des noyaux hépatiques

La technique que nous avons utilisée est très proche de celle décrite par WIDNELL et TATA (65). Nos expériences ont généralement porté sur un nombre de rats variant de 3 à 6. Après sacrifice des animaux par section de la carotide une portion de chacun des foies est prélevée, de telle sorte que le poids d'organe soit d'environ 7g. Le tissu est immédiatement plongé dans un milieu d'isolement maintenu froid comprenant du saccharose 0,32M et du $MgCl_2$ 2mM. Les foies sont alors émincés et rincés avec le milieu d'isolement afin d'éliminer le sang retenu par l'organe.

L'homogénéisation est ensuite réalisée dans un homogénéiseur type Potter à piston de téflon à raison d'un volume de tissu pour 3 du milieu d'isolement. Douze allers et retours du piston tournant à 700 tours par minute sont nécessaires pour parfaire l'homogénéisation. L'homogénat est ensuite déposé sur un tissu de nylon (nylon bolting Cloth 110mesh) préalablement lavé. Les débris tissulaires sont ainsi en grande partie retenus. Un volume de 12,5ml du filtrat est dilué à 20ml avec 7,5ml de saccharose 0,32M. Puis un volume d'eau préalablement déterminé est ajouté afin de ramener la molarité du saccharose de 0,32M à 0,25M. On dépose avec précaution au fond du tube contenant la

suspension précédemment préparée 20ml de saccharose 0,32M en évitant que les couches de densité différente ne se mélangent. Le gradient ainsi réalisé est centrifugé à 900g dans une centrifugeuse réfrigérée. Le culot obtenu, particulièrement riche en noyaux, est repris dans 13ml de saccharose 2,4M, remis en suspension et centrifugé à 50.000g dans une centrifugeuse BECKMAM-SPINCO, modèle L-rotor 40 pendant 1 heure

La fraction qui demeure en surface est principalement constituée d'hématies et de mitochondries. Au fond du tube se trouve le précipité de noyaux. Ce dernier est repris dans une quantité de saccharose 0,25M telle que la concentration en protéines de la suspension soit d'environ 10mg par ml.

6-Détermination des activités enzymatiques spécifiques des particules subcellulaires.

a - Monoamine oxydase (E.C 1-4-3-4)

La méthode utilisée est une méthode oxygraphique. Elle est basée sur la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder une amine primaire servant de substrat (66).



La consommation d'oxygène est mesurée au moyen d'un appareil polarographique muni d'une électrode vibrante en platine recouverte d'une fine membrane de polythène (GILSON GME). Dans la cuve de l'oxygraphe on introduit successivement 1,5ml de tampon phosphate sodique 0,2M pH7,4 préalablement oxygéné jusqu'à saturation, puis après équilibration à 25°C une quantité aliquote de la suspension particulaire, enfin 25µl de chlorhydrate de tyramine 0,1M. Les résultats sont exprimés en µM d'oxygène consommé par minute et par mg de protéine particulaire. L'enregistrement qui fait l'objet de la figure 1 montre que la consommation d'oxygène, donc l'activité de l'enzyme, est proportionnelle au volume de la suspension mitochondriale ajoutée dans la cuve oxygraphique.



Figure 1 -Consommation d'oxygène de milieux d'incubation renfermant des doses croissantes de préparations mitochondriales hépatiques en présence de tyramine 0,1M

b - Cytochrome oxydase (E.C. 1-9-3-1)

L'activité de la cytochrome oxydase est déterminée par une méthode polarographique en mesurant la consommation d'oxygène avec une électrode vibrante à 25°C (67). Le milieu d'essai contient : tampon phosphate (pH7,2) 75mM, cytochrome c 30µM, ascorbate de sodium 3,75mM et N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine, 2 HCl (TMPD) 0,3mM

Le tampon phosphate (1,5ml) est d'abord introduit dans la cuve, puis 20µl d'une solution d'antimycine A à 100µg par ml. L'antimycine A est un inhibiteur respiratoire dont le site d'intervention se situe au niveau du cytochrome b sur la chaîne des transporteurs d'électrons (72). On ajoute successivement dans la cuve l'enzyme, 25µl de cytochrome c, 25µl de TMPD, et enfin 25µl du substrat, c'est à dire l'ascorbate de sodium. Les résultats sont exprimés en µM d'oxygène consommé par minute et par mg de protéine.

La figure 2 reproduit un enregistrement obtenu avec une quantité de mitochondries titrant 0,40mg de protéines.

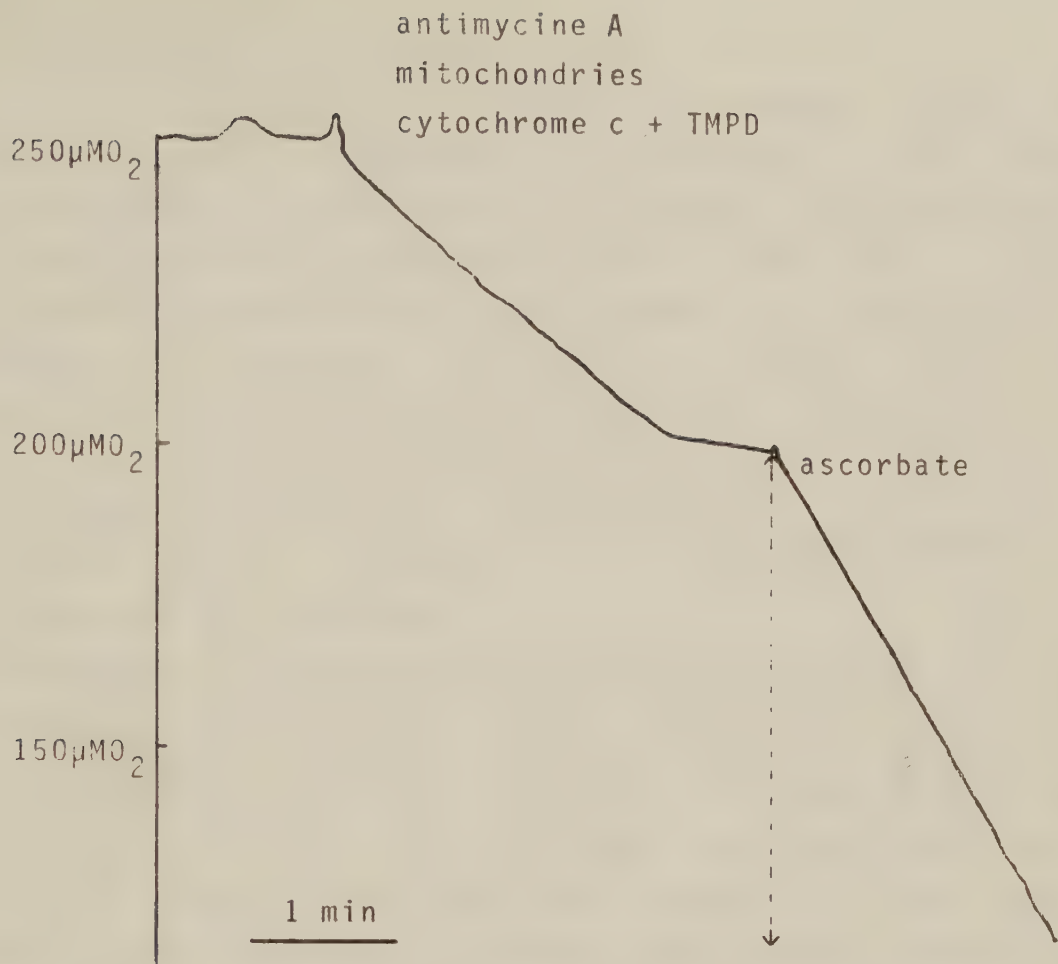


Figure 2- -Enregistrement illustrant la variation de consommation d'oxygène d'une préparation renfermant la cytochrome oxydase en présence d'ascorbate 3,75mM. Conditions décrites dans le texte.

c - Glucose 6-phosphatase (E.C. 3-1-3-9)

Nous utilisons la méthode de SWANSON modifiée (68). La suspension de microsomes ou de mitochondries est incubée dans 0,20ml de tampon citrate de sodium 0,1M (pH6,2) avec 0,10ml de glucose 6-phosphate 0,04M (volume final 0,40ml) pendant 30 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée en refroidissant les tubes dans la glace et en ajoutant 0,10ml d'une solution de sérum albumine bovine à 5% et 2ml de HClO_4 10% (P/V). Après centrifugation et filtration les phosphates inorganiques sont dosés par la méthode de LOWRY et LOPEZ (69). Des témoins substrat et enzyme sont réalisés simultanément.

-Dosage des phosphates

On compare l'intensité de la coloration de 0,50ml du filtrat précédent à celle d'une solution de phosphate de concentration connue. Le réducteur utilisé est une solution aqueuse d'acide ascorbique à 1%. Le filtrat est transféré dans un tube à essai contenant: 0,50ml d'acétate de sodium 1,5M, 7,0ml de tampon acétate 0,125M pH4, 1,0ml de molybdate d'ammonium à 1% dans H_2SO_4 0,05N. Puis on ajoute 1,0ml de solution réductrice (acide ascorbique) et on mesure la densité optique au bout de 10 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre différentiel BECKMAN DB à 700 nm.

Le zéro en densité optique se fait avec l'essai blanc. Les résultats sont exprimés en nmole de phosphate inorganique libéré par minute et par mg de protéine.

d - NADPH-cytochrome c réductase

L'activité est mesurée spectrophotométriquement à 25°C en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm (70) (71). Dans deux cuves de 1,0cm d'épaisseur sont ajoutés 2,2ml de tampon phosphate 50mM (pH7,5), 0,10ml de cytochrome c 0,1mM et 0,15ml de KCN 3mM. L'enzyme est mis dans les deux cuves qui sont alors placées dans le spectrophctomètre afin de régler le zéro optique. A l'aide de seringues sont injectés respectivement dans la cuve d'essai et de référence 0,10ml de NADPH

0,1mM et 0,10ml de son solvant. La réduction du cytochrome c est alors suivie dans un intervalle de temps de 3 minutes, Les activités sont déterminées en nmoles de cytochrome c réduit par minute et par mg de protéine .

7-Estimation de la contamination microsomale

Les activités de la NADPH-cytochrome c réductase et de la glucose 6-phosphatase, des marqueurs spécifiques des microsomes, ont été déterminées de façon systématique afin d'estimer la contamination par cette fraction de nos préparations mitochondriales.

Le tableau 1 reproduit les valeurs obtenues au cours d'une de nos expériences.

Tableau 1 - Activités de la NADPH-cytochrome c réductase et de la glucose 6-phosphatase et détermination du pourcentage de contamination par les microsomes des mitochondries

§ exprimée en nmoles de cytochrome c réduit par minute et par mg de protéine
+ exprimée en nmoles de phosphate libéré par minute et par mg de protéine

Fraction subcellulaire	NADPH-cytochrome c réductase §	Glucose 6-phosphatase +
Microsomes	80	126
Mitochondries	2,3	4,1
% de contamination	2,9	3,3

II - Préparation et qualités des particules subcellulaires de souris naines

Les techniques de préparation des homogénats et d'isolement des particules sont analogues à celles que nous avons décrites pour le rat. Mais compte tenu des caractères morphologiques de ces animaux, nous avons dû dans certains cas les adapter aux faibles quantités de tissu dont nous disposions. Les tests de pureté sont les mêmes que ceux retenus pour les particules de rats.

1- Isolement des particules

Les mitochondries hépatiques sont préparées par les techniques de SCHNEIDER et HOGEBROOM (60) et de BEATTIE (62). Les foies provenant généralement de 12 souris normales (N) ou de 25 souris naines (dw) sont prélevés et l'homogénat est préparé dans le saccharose 0,25M. Le poids de tissu au départ est d'environ 3g. Un foie de souris dw pèse environ 300mg. A partir de cet homogénat sont isolés soit les mitochondries, soit les microsomes dans les conditions que nous avons précisé dans le chapitre précédent.

Nous avons isolé les noyaux en adaptant la technique décrite par WIDNELL et TATA (65) à ce matériel biologique.

2- Qualités des particules isolées

Comme pour les particules de rat la qualité et la pureté de nos préparations ont été testées par détermination des activités spécifiques enzymatiques.

Nous avons ainsi contrôlé les activités de la monoamine oxydase, de la cytochrome oxydase, de la glucose 6-phosphatase et de la NADPH-cytochrome réductase.

III - Propriétés biochimiques des mitochondries

Les protéines mitochondriales sont dosées par une méthode rapide basée sur la réaction du BIURET et les propriétés oxydophosphorylantes des particules sont déterminées par polarographie. L'estimation quantitative des cytochromes est réalisée par spectrophotométrie.

1-Dosage des protéines

La plupart de nos expériences ont imposé l'emploi de quantités connues de mitochondries, aussi devons nous au préalable réaliser le dosage de leurs protéines par une méthode rapide.

principe: Les membranes sont lysées par le cholate, la teneur en protéines est déterminée par la réaction du BIURET en se référant à une gamma étalon de sérum albumine bovine. On lit l'intensité de la coloration à 540nm.

réactifs: Solutions aqueuses de:

- sérum albumine bovine à 5mg par ml
- cholate de sodium à 4% (p/v)
- NaOH 10% (p/v)
- CuSO₄ 1% (p/v)

mode opératoire: A une prise d'essai de la gamme ou du dosage on ajoute 0,20ml de la solution de cholate, après agitation on complète à 2,7ml avec la solution de soude. Ensuite 0,30ml de la solution de CuSO₄ sont additionnés et on attend 10 minutes avant de lire afin que la coloration se stabilise.

Cette méthode rapide nous permet de doser les protéines avant les essais de façon à se placer dans des conditions comparables d'une expérience à l'autre. Ce procédé s'applique également aux préparations nucléaire et microsomale.

Lorsque les quantités de protéines sont très faibles, le dosage est réalisé par la méthode de LOWRY (73).

2-Propriétés oxydophosphorylantes

La qualité des mitochondries dépend de l'activation de leur vitesse respiratoire en présence d'ADP et de leur capacité de phosphorylation

a - Index de contrôle respiratoire

On le définit comme étant le rapport de la vitesse respiratoire des mitochondries placées dans l'état actif ou état 3, c'est à dire en présence d'accepteur de phosphate, sur celle de l'état contrôlé ou état 4, c'est à dire en présence du substrat seul. L'index de contrôle respiratoire peut également être déterminé à partir de la vitesse respiratoire de l'état contrôlé mesuré après consommation de l'ADP (état 4') (76). La consommation d'oxygène est mesurée au moyen d'un appareil polarographique GILSON (GME) muni d'une électrode vibrante en platine recouverte d'une membrane de polythène. On introduit de 1 à 3mg de protéines mitochondriales dans la cellule contenant 1,6ml d'une solution tampon (pH 7,35) qui a la composition suivante: NaF 12mM, K_2HPO_4 13mM, KH_2PO_4 3mM, $MgCl_2$ 6mM, KCl 56mM, NaCl 26mM et qui est préalablement oxygénée jusqu'à saturation. Les substrats utilisés sont le succinate, le β -hydroxybutyrate ou le glutamate-malate. Le milieu est supplémenté par de la rotenone (0,7 μ g/ml) pour éviter le reflux des électrons vers le NAD lorsque le substrat est le succinate. Le malonate, un inhibiteur de la succinate déshydrogénase, est ajouté à la concentration finale de 3mM lors de l'emploi des substrats de la voie du NAD. Pour passer dans l'état activé on ajoute une solution d'ADP à 7,2mg par ml.

L'enregistrement de la figure 3 montre les changements de la consommation d'oxygène des mitochondries avant et après addition d'ADP. Le rapport des pentes donne directement la valeur du contrôle respiratoire (RC) qui est de 5,5 dans cet exemple.

b - Rapport P/O

La quantité d'ATP apparue dépend de la nature du substrat utilisé. Deux moles d'ATP sont formées en présence de succinate, trois avec le β -hydroxybutyrate. La concentration en O_2 du tampon saturé à 25°C est de 250 μ M. L'ordonnée étant de 30cm, 1cm correspond à $250/30 = 8,3\mu$ M d' O_2 . Dans l'exemple de la figure 3 $h = 4,9$ cm représente la quantité d' O_2 consommée durant la synthèse de l'ATP, soit $4,9 \times 8,3 = 41\mu$ M d'oxygène moléculaire ou 82 μ -atome gramme par litre. Cette quantité permet la

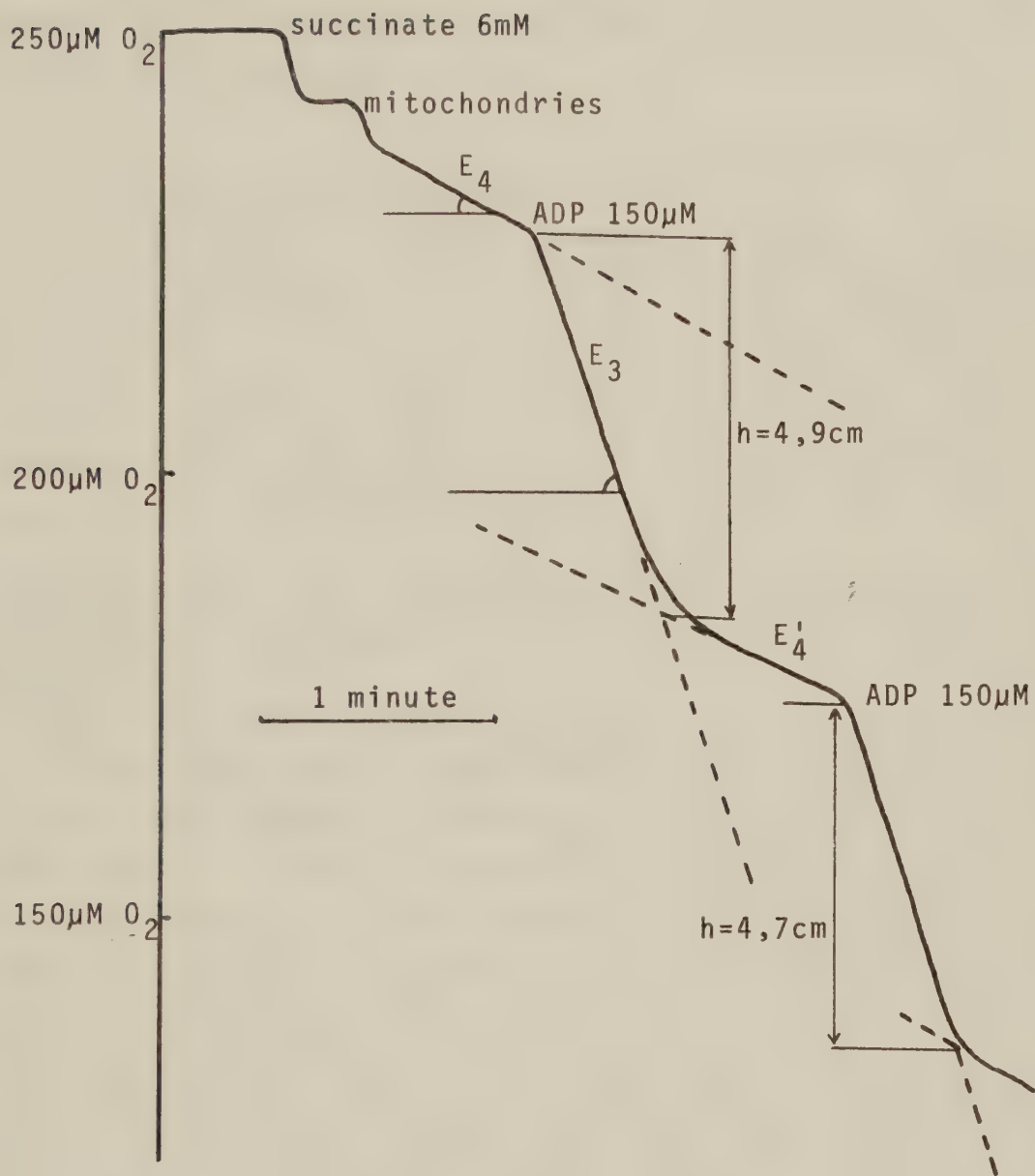


Figure 3 -Enregistrement illustrant la variation de la consommation d'oxygène avant et après addition d'ADP 150 μM

E_4 =état contrôlé en présence du substrat seul
 E_3 =état activé
 E'_4 =état contrôlé après consommation de l'ADP

fixation de phosphate à $150\mu\text{M}$ d'ADP. Le rapport P/O est de $150/82=1,8$. Comme la capacité de phosphorylation est théoriquement de 2, la préparation des mitochondries est satisfaisante pour les essais ultérieurs.

3-Dosage_des_cytochromes

La méthode utilisée permet une estimation quantitative des cytochromes a, b, c_1 et c sur la même préparation de mitochondries (74)(75). On enregistre le spectre différentiel des formes oxydées et réduites des cytochromes de l'échantillon. Pour chaque cytochrome aux deux longueurs d'onde spécifiques, une correction est effectuée afin d'éliminer les interférences dues aux trois autres cytochromes.

Mode opératoire: Une suspension de mitochondries dans le saccharose 0,25M est préparée et ajustée approximativement à 35mg de protéines par ml.

Dans deux cuves de 1cm d'épaisseur sont ajoutés 1,0ml de la suspension, 0,40ml de phosphate de sodium 0,1M (pH7,4) et 0,20ml d'une solution de désoxycholate à 20% (p/v). Dans la cuve 1 on met 0,20ml d'ascorbate de sodium 0,05M et 0,20ml d'eau. Après avoir agité et attendu 1 minute quelques cristaux d'hydrosulfite de sodium sont ajoutés. Lorsque les cristaux sont dissous, la cuve 1 renfermant les formes réduites des cytochromes peut être utilisée.

Le contenu de la cuve 2 est additionné de 0,20ml de ferri-cyanure de potassium 0,05M et de 0,20ml d'eau. Le spectre des formes réduites contre les formes oxydées est enregistré entre 500 et 630 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre BECKMAN-DB. Les deux longueurs d'onde spécifiques de chaque cytochrome, auxquelles les différences d'absorption sont mesurées, sont les suivantes: 550 et 535 nm pour le cytochrome c, 554 et 540 nm pour le cytochrome c_1 , 563 et 577 nm pour le cytochrome b, 605 et 630 nm pour le cytochrome a.

Traitement des résultats: Pour calculer la concentration de chaque cytochrome à partir des résultats obtenus auparavant 4 équations à 4 inconnues doivent être résolues. Les différen-

ces dans les coefficients d'extinction mM pour chaque cytochrome aux 4 paires de longueurs d'onde sont reportés dans le tableau ci-dessous (77)(78)(79).

Cytochromes	Longueurs d'onde			
	605-630	563-577	554-540	550-535
a	12 ⁺	-0,326	0,95	0,63
b	0	14,3 ⁺	2,55	-3,12
c	-0,59	0,91	18,8 ⁺	10,3
c ₁	-0,22	-1,16	6,51	21,0 ⁺

(⁺) coefficients majeurs

Les équations suivantes sont obtenues:

$$21,0 X_1 + 10,3 X_2 - 3,12 X_3 + 0,63 X_4 = Y_1$$

$$6,51 X_1 + 18,8 X_2 + 2,55 X_3 + 0,95 X_4 = Y_2$$

$$-1,16 X_1 + 0,91 X_2 + 14,3 X_3 - 0,326 X_4 = Y_3$$

$$-0,22 X_1 - 0,59 X_2 + 0 X_3 + 12 X_4 = Y_4$$

X_1, X_2, X_3 et X_4 expriment les concentrations en μ moles par ml dans la cuve des cytochromes c, c₁, b et a.

Y_1 représente la différence d'absorption entre 550 et 535 nm, Y_2 entre 554 et 540 nm, Y_3 entre 563 et 577 nm, Y_4 entre 605 et 630 nm.

Les techniques générales qui viennent d'être exposées ne seront pas répétées dans les chapitres suivants, seules les conditions expérimentales particulières seront décrites.

D E U X I E M E P A R T I E
=====

OXYDOPHOSPHORYLATIONS MITOCHONDRIALES

ET BIOSYNTHESE DES PARTICULES SUBCELLULAIRES

CHEZ LE RAT NORMAL ET HYPOTHYROIDIEN

Les hormones thyroïdiennes possèdent des propriétés multiples qui peuvent être classées en deux catégories principales: d'une part celles qui contrôlent la croissance et le développement, et d'autre part celles qui règlent l'activité métabolique. Les premières traduisent le rôle sur la biosynthèse des protéines (5), les secondes caractérisent surtout l'influence sur les oxydophosphorylations mitochondriales (6)(80). On peut se demander dans quelle mesure ces deux phénomènes dépendent l'un de l'autre. Une hypothèse soutenue surtout par TATA, postule que l'effet sur la respiration est une conséquence d'une synthèse accrue des ensembles multienzymatiques qui interviennent dans les réactions d'oxydophosphorylation (81). D'autres prétendent que l'effet primaire des phénols iodés endogènes se manifeste sur le fonctionnement mitochondrial avant toute activation sur le métabolisme protéique (82)(83)(84).

Nous avons donc entrepris ce travail avec des rats normaux et thyroïdectomisés, afin de préciser quelles sont les relations éventuelles entre la synthèse protéique et les changements respiratoires.

CHAPITRE I

PROPRIETES BIOCHIMIQUES COMPAREES DE MITOCHONDRIES DE RATS NORMAUX ET HYPOTHYROIDIENS

Les hormones thyroïdiennes augmentent le métabolisme basal tandis que la thyroïdectomie le diminue (85). Cet effet se traduit au niveau de la plupart des organes par une élévation de la consommation d'oxygène, mais puisque le QO_2 représente surtout la somme des activités élémentaires respiratoires des mitochondries, on conçoit que le fonctionnement de ces granulations subcellulaires dépende de l'état thyroïdien. On a montré d'ailleurs que les particules qui proviennent d'animaux hypothyroïdiens respirent plus faiblement que celles isolées à partir de tissus prélevés chez des témoins normaux ou chez des sujets ayant reçu un traitement hormonal chronique (86).

Cependant les données obtenues jusqu'ici proviennent d'expériences où les contrôles physiologiques font en partie défaut (86)(84)(87).

Nous avons repris cette étude en suivant l'évolution pondérale des animaux et en mesurant leur métabolisme basal avant d'entreprendre l'isolement des mitochondries.

Les propriétés oxydophosphorylantes, les concentrations en cytochromes et les activités enzymatiques d'organites provenant d'animaux hypothyroïdiens sont comparées à celles des particules d'animaux normaux.

I - Propriétés oxydophosphorylantes

Les propriétés oxydophosphorylantes sont étudiées sur des mitochondries isolées du foie, du rein et du cœur, animal par animal et en présence de divers substrats.

1-Conditions expérimentales

Des rats albinos Wistar mâles de 50g environ sont thyroïdectomisés par une méthode chirurgicale. Les animaux sont pesés régulièrement et un choix est fait en fonction de ce critère pondéral. La figure 4 reproduit les courbes de poids des deux lots de rats. Afin de ne pas surcharger les figures et les tableaux nous utiliserons les abréviations N pour les animaux témoins et Thx pour les rats thyroïdectomisés. Sur les deux séries de rats ainsi sélectionnés nous avons procédé à la mesure du métabolisme de base en utilisant l'appareil de Bargeton. Les valeurs de ces déterminations sont exprimées en calories par heure et par m^2 de surface corporelle (88)(89)(90). Nous avons retenu les animaux dont le métabolisme basal était inférieur à 33 chez les hypothyroïdiens et supérieur à 44 chez les normaux (tableau 2). Dans des conditions semblables on utilise chaque fois un sujet hypothyroïdien et un normal. La préparation des organites est conduite comme il a été indiqué dans les techniques générales.

Avant d'entreprendre les essais polarographiques, on détermine la teneur en protéines des suspensions. Les dosages qui exigent une vingtaine de minutes sont indispensables pour réaliser les mesures des vitesses respiratoires et des rapports P/O dans des conditions de même concentration. Nous avons adopté 3mg de protéines mitochondriales hépatiques, 2mg de protéines rénales et 1,2mg de protéines cardiaques comme prise d'essai. Ces quantités sont obtenues en ajustant le volume mis dans la cuve de l'oxygraphe en fonction de la teneur en protéines.

La consommation d' O_2 des préparations mitochondriales est suivie en présence de trois substrats, le succinate à la concentration de 6mM, le β -hydroxybutyrate 14mM et le mélange glutamate-malate 5mM.

2-Résultats

a - Mitochondries hépatiques

Les résultats reportés sur le tableau 2 sont les moyennes des valeurs obtenues au cours de 10 expériences.

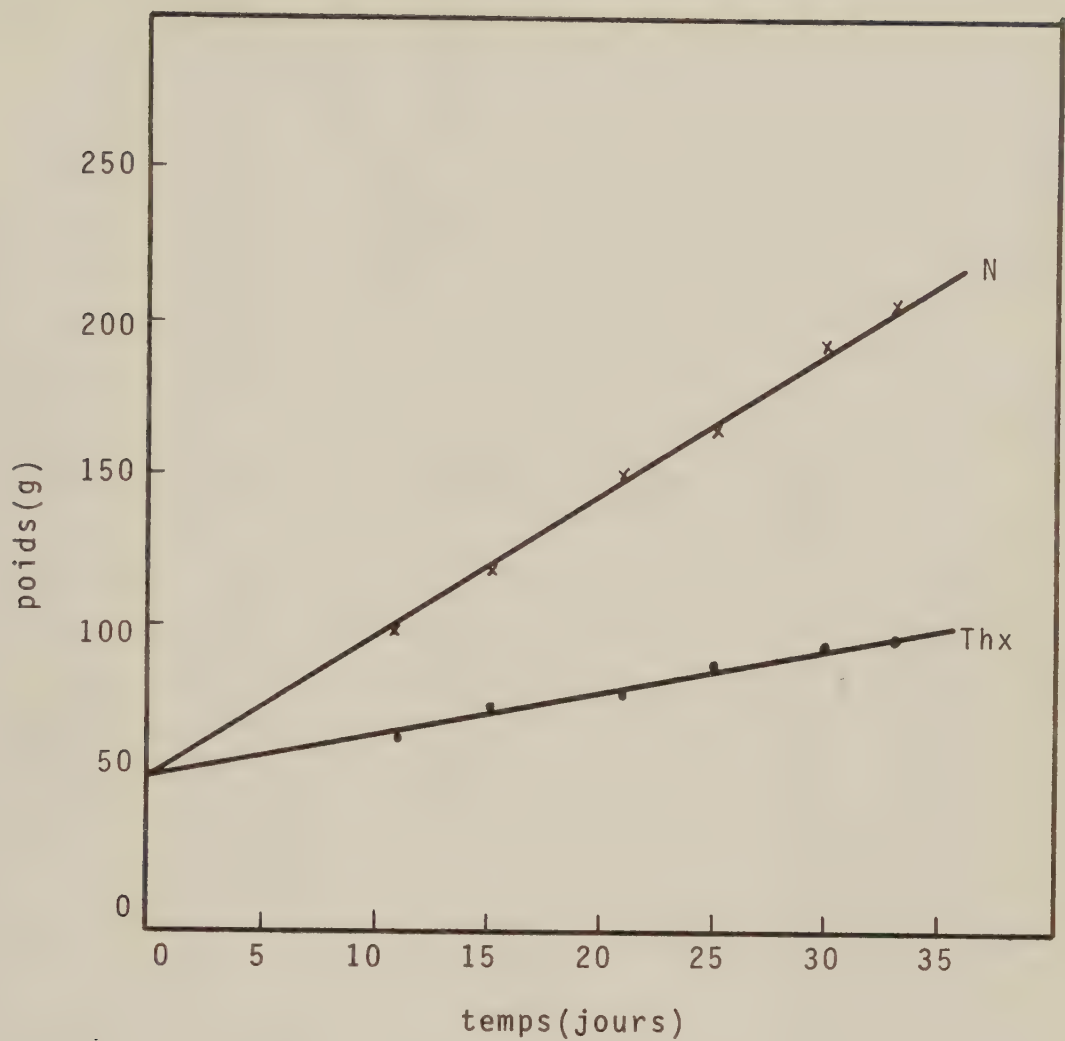


Figure 4 -Courbes de poids des deux lots de rats utilisés pour l'étude des propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries hépatiques.

N=rats normaux

Thx=rats thyroïdectomisés

Tableau 2 - Vitesses de la respiration des mitochondries hépatiques de rats normaux et thyroïdectomisés en présence de succinate 6mM et de β -hydroxybutyrate 14mM comme substrats (mesures réalisées à 1^o oxygraphe, chaque essai renferme 3mg de protéines mitochondriales).

Conditions expérimentales décrites dans le texte.
P=poids des animaux en g
MB=métabolisme basal exprimé en calories par heure et par m² de surface corporelle
E₃=vitesse respiratoire en présence du substrat seul exprimée en μ O₂ par minute et par mg de protéine

Substrat	Normaux					Thyroïdectomisés				
	P	MB	E ₄	E ₃	RC	P/O	P	MB	E ₄	E ₃ RC P/O
Succinate	240	48,7	5,8	30,8	5,30	1,7	112	28,2	4,17	21,7 5,23 1,8
β -Hydroxy-butyrat	240	48,7	2,3	7,2	3,13	2,3	112	28,2	1,8	8,0 4,42 2,4

E₃=vitesse respiratoire après addition d'ADP (200 μ M)
RC=index de contrôle respiratoire
P/O=capacité de phosphorylation
(chaque résultat est la moyenne de 10 essais)

Pour chaque animal et chaque substrat, c'est à dire le succinate et le β -hydroxybutyrate, nous avons déterminé la vitesse respiratoire dans l'état 4 ou contrôlé, donc en présence du substrat seul, puis celle dans l'état 3 ou activé après addition d'ADP. Nous avons pu calculé l'index de contrôle respiratoire (RC), défini comme étant le rapport de la vitesse respiratoire des mitochondries placées dans l'état 3 sur celle de l'état 4.

Avec le succinate la consommation d'oxygène des mitochondries de sujets normaux est plus élevée que celle des mitochondries d'animaux hypothyroïdiens dans les états 3 et 4. De ce fait les index de contrôle respiratoire présentent des valeurs peu différentes.

Avec le β -hydroxybutyrate les vitesses respiratoires des mitochondries d'animaux normaux placés dans l'état 4 sont supérieures à celles de mitochondries de rats hypothyroïdiens. Donc en présence du substrat seul les résultats sont semblables à ceux obtenus avec le succinate. Mais par contre les index de contrôle respiratoire chez les rats normaux sont inférieurs à ceux des rats hypothyroïdiens.

Les résultats de l'étude statistique réalisée pour les valeurs des index de contrôle respiratoire avec les deux substrats et pour les deux séries d'animaux sont réunis sur les tableaux 3 et 4. La différence μ des moyennes arithmétiques des RC obtenus avec le succinate étant de 0,06, on en déduit la variance de μ qui est égale à 0,088. Le "nombre de degrés de liberté" calculé est de $(10+10-2)$ soit 18, donc le coefficient t de student est de 0,202. Dans 82% des cas les index de contrôle respiratoire seront semblables, la différence n'est donc pas significative.

Pour le β -hydroxybutyrate la différence μ des moyennes arithmétiques étant de 1,29, la variance de μ est de 0,186, le coefficient t de student s'élève à 2,995. Nous avons donc une probabilité de 99% pour que les index de contrôle respiratoire

Tableau 3 -Analyse statistique des index de contrôle
respiratoire (RC) en présence de succinate.

Analyse statistique	Normaux	Thyroïdectomisés
Moyenne arithmétique	5,30	5,24
Variance	0,282	0,600
Variance de la moyenne	0,028	0,060

Tableau 4 -Analyse statistique des index de contrôle
respiratoire (RC) en présence de B-hydroxy-
butyrate

Analyse statistique	Normaux	Thyroïdectomisés
Moyenne arithmétique	3,13	4,42
Variance	1,067	0,788
Variance de la moyenne	0,106	0,078

mesurés chez les rats normaux et thyroïdectomisés soient différents. Les écarts enregistrés sont donc hautement significatifs.

Il ressort de nos expériences que les vitesses respiratoires dans l'état 4 des mitochondries isolées à partir de sujets normaux sont plus élevées que celles constatées avec les particules d'animaux hypothyroïdiens, aussi bien en présence de succinate que de β -hydroxybutyrate. Il semble que la consommation d' O_2 soit légèrement plus élevée chez les hypothyroïdiens que chez les normaux en présence de β -hydroxybutyrate lorsque le milieu contient en plus de l'ADP.

La figure 5 illustre ces résultats. Elle reproduit les enregistrements oxygraphiques comparés obtenus avec des mitochondries provenant d'animaux normaux et hypothyroïdiens pour une prise d'essai de 3mg de protéines mitochondriales. La figure 6 représente la consommation d' O_2 dans les deux états thyroïdiens en présence de β -hydroxybutyrate dans les conditions où les quantités de mitochondries mises en jeu sont différentes, afin que les vitesses respiratoires dans l'état contrôlé soient voisines. On note un contrôle respiratoire supérieur chez l'hypothyroïdien, la consommation d'oxygène en présence d'ADP étant stimulée.

Afin de vérifier que les différences dans les propriétés oxydophosphorylantes des organites ne sont pas dues au fait que les rats témoins d'âge sont généralement deux fois plus lourds que les thyroïdectomisés de même âge, nous avons entrepris un travail semblable avec des témoins de poids, car il n'était pas impossible que les effets observés ne soient que le reflet de différence dans les réserves métaboliques des animaux. Les résultats sont reportés sur le tableau 5. Les valeurs sont les moyennes de cinq expériences. Les témoins d'âge pesaient 270g, les thyroïdectomisés 120g et les témoins de poids 120g. L'examen de ces valeurs montre que les témoins de poids se comportent vis à vis des hypothyroïdiens de la même manière que les témoins d'âge. Avec le β -hydroxybutyrate 14mM les index

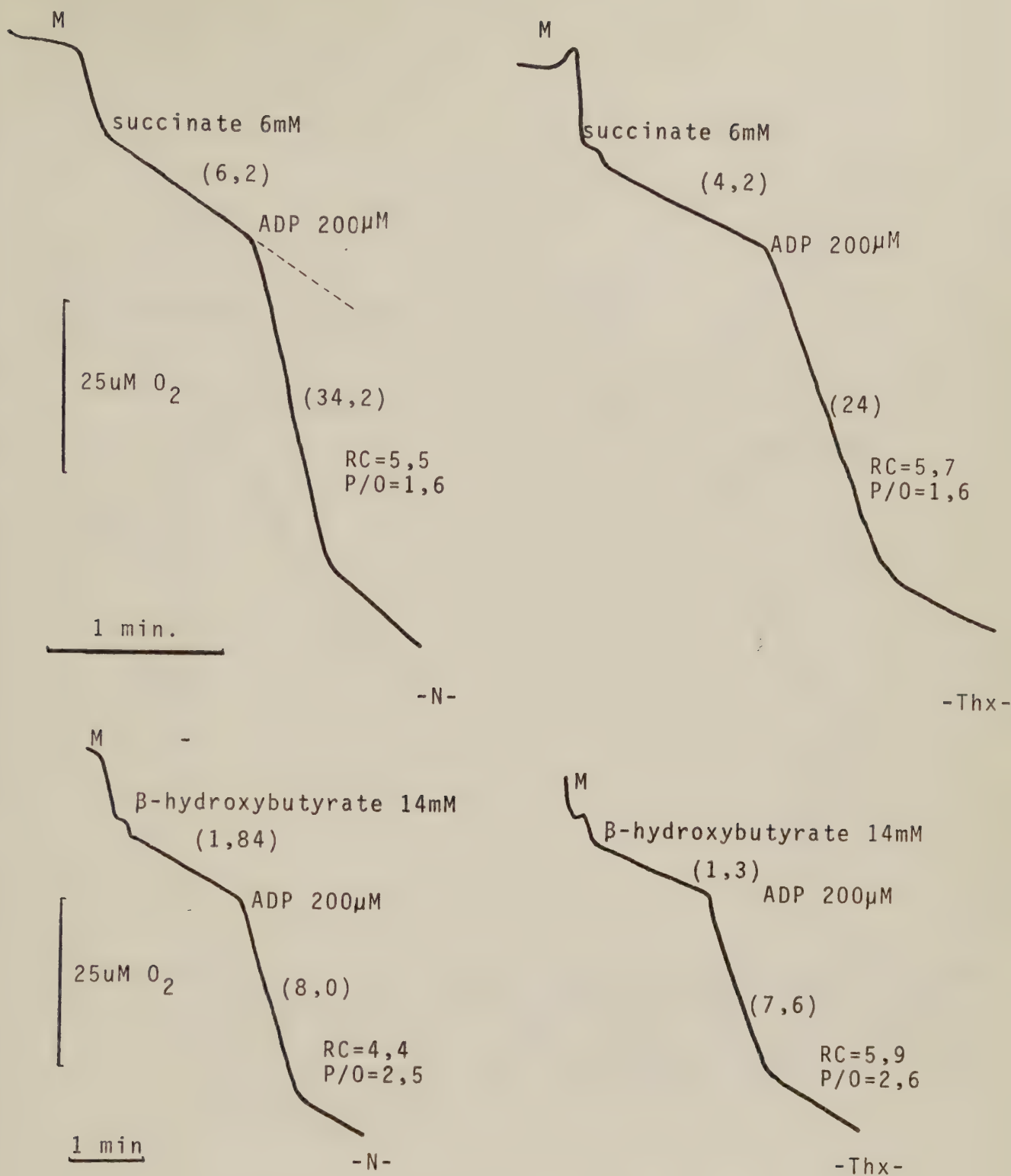


Figure 5 - Vitesses respiratoires comparées des mitochondries hépatiques préparées à partir de rats normaux (N) et hypothyroïdiens (Thx) en présence de succinate et de β -hydroxybutyrate. Entre parenthèses sont représentées les vitesses respiratoires exprimées en $\mu\text{M O}_2$ par minute et par mg de protéine. M=mitochondries

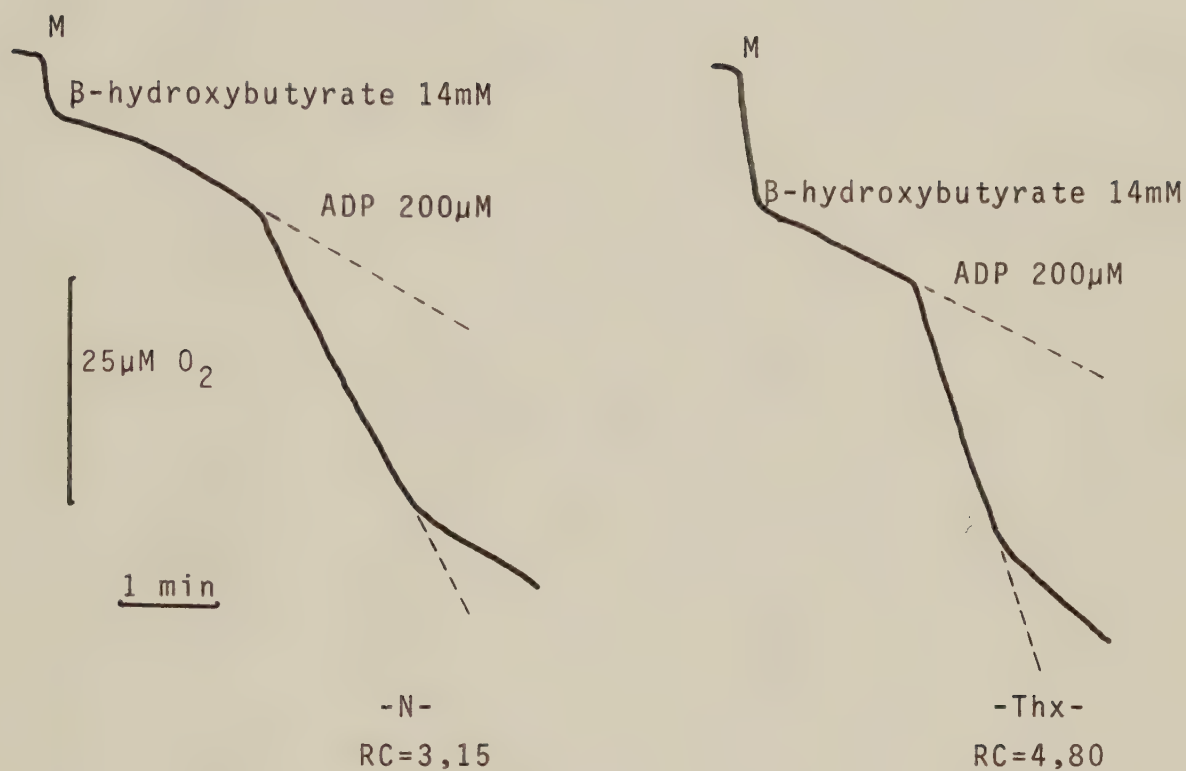


Figure 6 -Consommation d'oxygène des mitochondries de rats normaux (N) et hypothyroïdiens (Thx) en présence de β-hydroxybutyrate comme substrat dans les conditions où les quantités de mitochondries mises en jeu sont différentes afin que les vitesses dans l'état 4 soient voisines.
M=mitochondries

Tableau 5 - Vitesses respiratoires des mitochondries hépatiques de rats thyroïdectomisés, de rats normaux de même âge et de rats normaux de même poids que les animaux opérés en présence de succinate 6mM et de β -hydroxybutyrate 14mM.

Substrat	Normaux						Thyroïdectomisés		
	témoins de poids			témoins d'âge					
	E ₄	E ₃	RC	E ₄	E ₃	RC	E ₄	E ₃	RC
Succinate	6,9	36,3	5,3	4,4	23,8	5,4	4,7	22,1	4,7
β -Hydroxybutyrate	2,5	11,0	4,4	1,7	8,2	4,8	1,8	10,4	5,8

Chaque résultat est la moyenne de 5 essais.

de contrôle respiratoire des animaux thyroïdectomisés sont supérieurs à ceux des deux types de témoins.

L'hypothyroïdie peut indirectement entraîner une diminution de l'activité hypophysaire (91). La sécrétion de STH se trouve alors diminuée. Il faut noter que cette hypothèse repose sur des expériences dans lesquelles l'hypothyroïdie des animaux est obtenue par action d'un antithyroïdien, le propylthiouracile (PTU) (92). Or le spectre d'action pharmacologique de cette substance est large et on ne peut à priori éliminer la possibilité d'un effet au niveau de la glande hypophysaire elle-même. Néanmoins nous avons pensé qu'il était nécessaire de tester une telle hypothèse, afin de vérifier si cette baisse éventuelle de la sécrétion de STH, susceptible d'avoir des répercussions sur la biosynthèse des supports protéiques des oxydophosphorylations, ne pouvait être responsable des manifestations observées sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Pour cela nous avons administré à des lots de rats thyroïdectomisés de l'hormone de croissance, soit en une dose unique, soit à faible dose perdant plusieurs jours. Les résultats provenant de l'administration d'une dose unique de 0,2 USP-GH-S9 ovine (NIH-Bethesda) par animal trois heures avant le sacrifice, sont rassemblés dans le tableau 6. Les essais en chronique font l'objet du tableau 7. Les animaux reçoivent 50 m USP-GH S9 ovine (NIH-Bethesda) par jour et par animal pendant 14 jours. Simultanément nous avons traité un lot d'animaux thyroïdectomisés avec une quantité de TSH correspondant au taux de contamination de STH par cette hormone, soit 2 m USP ovine TSH-S6 (NIH-Bethesda). L'examen des tableaux 6 et 7 permet de constater que l'hormone de croissance injectée, bien qu'elle soit suffisante pour activer la croissance d'animaux hypophysectomisés, ne modifie en rien nos précédents résultats. Il ne semble donc pas que l'on puisse imputer à l'hormone de croissance, les effets observés au niveau du fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons.

Tableau 6 - Vitesses respiratoires de mitochondries hépatiques de rats normaux et thyroïdectomisés ayant reçu une dose unique de 200mUSP de STH ovine, en présence de Succinate 6mM et β -hydroxybutyrate 14mM.

Substrat	N			Thx (+STH)		
	E ₄	E ₃	RC	E ₄	E ₃	RC
Succinate	7,1	31,5	4,4	6,6	28,4	4,3
β -hydroxybutyrate	2,9	7,6	2,7	2,9	11,6	4,0

Vitesses exprimées en $\mu\text{MO}_2 \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

Tableau 7 - Vitesses respiratoires de mitochondries hépatiques de rats normaux, de rats thyroïdectomisés ayant reçu pendant 14 jours 50 mUSP de STH ovine et de rats thyroïdectomisés recevant 2mUSP de TSH ovine pendant 14 jours, en présence de Succinate 6mM et β -hydroxybutyrate 14mM.

Substrat	N			Thx (+TSH)			Thx (+STH)		
	E ₄	E ₃	RC	E ₄	E ₃	RC	E ₄	E ₃	RC
Succinate	5,0	22,3	4,4	5,0	24,0	4,7	4,7	21,1	4,5
β -hydroxybutyrate	2,3	6,5	2,8	2,1	10,0	4,7	1,9	10,5	5,4

Vitesses exprimées en $\mu\text{MO}_2 \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

STH=GH

b - Mitochondries rénales et cardiaques

Nous avons étendu les recherches sur les propriétés oxydophosphorylantes dans divers états thyroïdiens à des mitochondries provenant d'organes ayant des spécialisations métaboliques et physiologiques très différentes tels que le rein et le coeur. Les lots d'animaux ont été préparés dans les mêmes conditions que ceux utilisés pour l'étude des organites de foie.

Pour les mitochondries isolées des deux organes nous avons déterminé les vitesses respiratoires en présence du substrat seul, après adjonction d'ADP et finalement en présence de l'ATP formé à partir de l'ADP ajouté et de l'ADP endogène. Les résultats reportés sur le tableau 8 sont les moyennes des valeurs obtenues au cours de 8 expériences menées avec les mitochondries de rein. Les essais oxygraphiques ont été réalisés de façon systématique avec une quantité de mitochondries correspondant à 2mg de protéines.

On constate que les vitesses de consommation d' O_2 dans les différents états respiratoires sont plus faibles chez les animaux hypothyroïdiens. Les index de contrôle respiratoire, qu'ils soient calculés avec les valeurs obtenues en état 4 ou en état 4', sont peu différents. L'état thyroïdien ne semble pas modifier les index de contrôle respiratoire que le substrat utilisé soit le succinate ou le glutamate-malate. Il est intéressant de noter que dans les conditions de nos essais, les mitochondries de rein se sont avérées incapables d'oxyder le β -hydroxybutyrate. Il n'est pas impossible que ce tissu présente un déficit en β -hydroxybutyrate déshydrogénase.

Le tableau 9 rend compte des résultats obtenus lors des mêmes expériences réalisées avec des mitochondries cardiaques. 1,2 mg de la suspension mitochondriale exprimée en protéine fut utilisé. On remarquera que la quantité de protéines mise dans la cuve de l'oxygraphe est beaucoup plus faible pour le rein et surtout le coeur que pour le foie, et pourtant les activités respiratoires sont plus élevées. Ceci est certainement

Tableau 8 - Vitesses de la respiration de mitochondries de rein de rats normaux et thyroïdectomisés en présence de succinate 6mM et du mélange glutamate-malate 5mM comme substrats ($\mu\text{M}\text{O}_2$ par minute et par mg de protéine).

Pour chaque essai 2mg de protéines mitochondriales sont utilisés. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte. Les index de contrôle respiratoire sont calculés à partir des consommations d' O_2 mesurées dans les états 4 (RC) et 4' (RC').

Substrat	Normaux						Thyroïdectomisés					
	E_4	E_4'	E_3	RC	RC'	P/O	E_4	E_4'	E_3	RC	RC'	P/O
Succinate	14,4	15,0	57	3,9	3,8	1,7	9,8	10,8	44	4,5	4,1	1,7
Glutamate-malate	6,4	8,3	35	5,5	4,2	2,6	4,7	5,9	26	5,4	4,3	2,7

Chaque résultat est la moyenne de 8 essais.

Tableau 9 - Vitesses de la respiration des mitochondries de coeur de rats normaux et thyroïdectomisés en présence de succinate 6mM, β -hydroxybutyrate 14mM et glutamate-malate 5mM comme substrats (μMO_2 par minute et par mg de protéine).
 Pour chaque essai 1,2mg de protéines mitochondriales sont utilisés.

Substrat	Normaux						Thyroïdectomisés					
	E ₄	E ₄ '	E ₃	RC	RC'	P/O	E ₄	E ₄ '	E ₃	RC	RC'	P/O
Succinate	35	37	74	2,1	2,0	1,8	28,7	29	68,5	2,5	2,5	1,9
Glutamate-Malate	11,9	11,7	54	4,9	4,6	2,8	9,3	7,7	45,5	5,1	5,9	2,9
β-Hydroxybutyrate	7,5	7,6	36	4,8	4,8	2,9	6,9	5,2	30,5	4,5	5,9	2,8

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte et semblables à celles du tableau 8.
 Chaque résultat est la moyenne de 8 essais.

lié, comme le révèle une étude de l'ultrastructure des mitochondries (93), à l'existence dans les particules rénales et cardiaques d'un plus grand nombre de crêtes sur lesquelles les enzymes du transport des électrons et des phosphorylations oxydatives sont localisées.

L'analyse des résultats rassemblés dans le tableau 9 permet de faire un certain nombre d'observations. Tout d'abord comme nous l'avons déjà constaté pour les mitochondries isolées à partir du foie et du rein, les vitesses respiratoires dans l'état contrôlé sont plus faibles chez les animaux thyroïdoprives. Cette baisse d'activité consécutive à la thyroïdectomie est beaucoup plus marquée lorsque l'on considère l'état contrôlé après phosphorylation de l'ADP en présence des substrats de la voie du NAD, le mélange glutamate-malate et le β -hydroxybutyrate. Ce phénomène se répercute évidemment sur les valeurs des index de contrôle respiratoire. Comme on peut le voir sur le tableau 9 les RC et les RC' sont semblables chez les rats normaux et très proches des RC des animaux thyroïdectomisés. Par contre les RC' de cette dernière catégorie sont plus élevés et particulièrement lorsque le β -hydroxybutyrate est le substrat.

II - Concentrations en cytochromes

L'enregistrement du spectre différentiel des formes oxydées et réduites des 4 cytochromes a, b et $c+c_1$ nous a permis de déterminer leurs concentrations, exprimées en nM par mg de protéine dans des préparations de mitochondries isolées de foie de rats normaux et thyroïdectomisés.

La figure 7 représente les variations des quantités de cytochromes en fonction de la quantité de protéines mitochondriales. Nous avons d'abord effectué une étude analytique préalable afin de tester la sensibilité de la méthode et de vérifier la reproductibilité des valeurs obtenues, puis nous avons entrepris des recherches afin de comparer les concentrations des cytochromes dans divers états thyroïdiens.

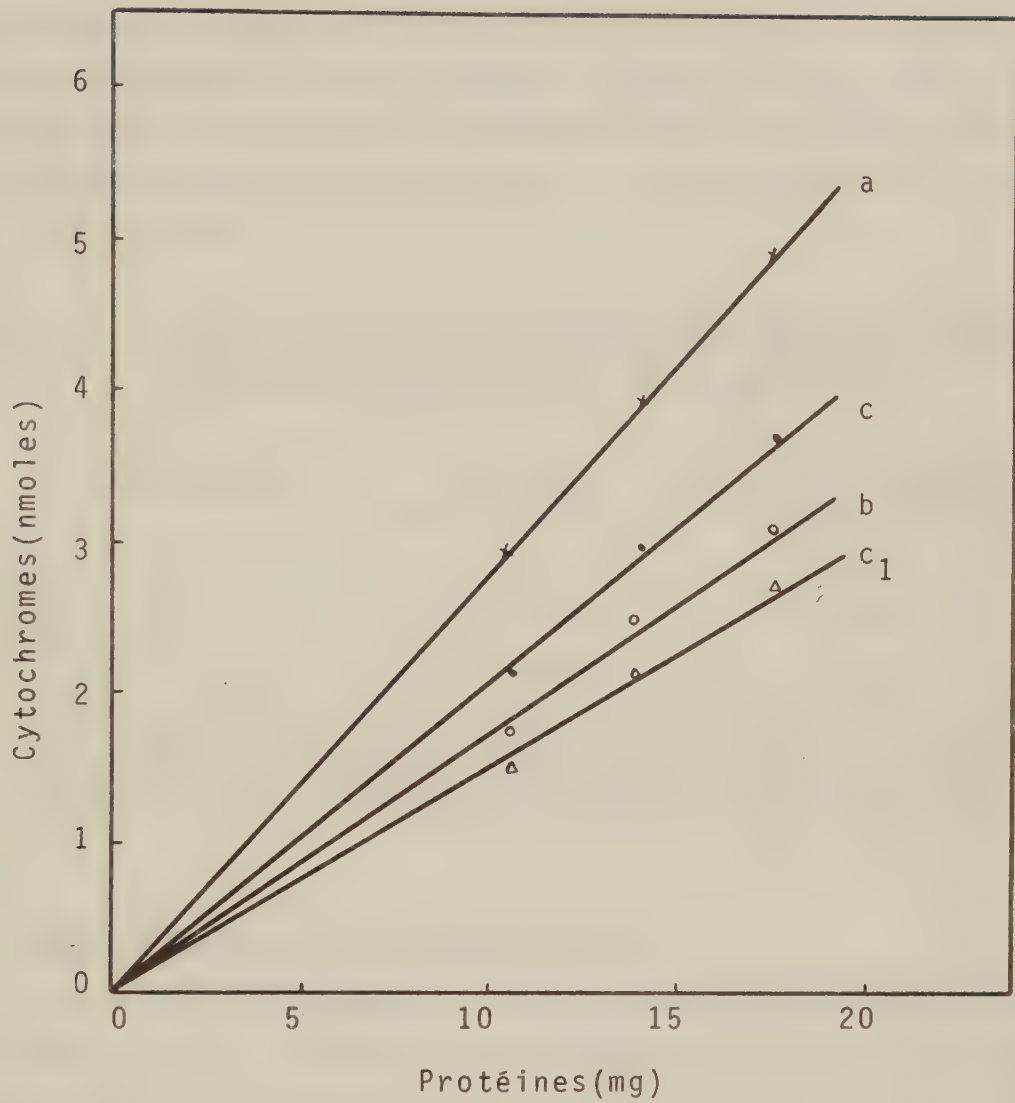


Figure 7 -Relation entre les concentrations en cytochromes et les quantités de protéines mitochondriales dans la cuve.

La figure 8 reproduit les spectres différentiels enregistrés à partir de mitochondries de rats normaux (A) et de rats thyroïdectomisés (B). Les valeurs reportées sur le tableau 10 sont les moyennes de trois mesures, trois animaux ayant été utilisés pour chacune. On ne constate aucune différence dans les concentrations en cytochromes a, b et c+c₁ dans les deux états thyroïdiens.

Tableau 10 - Concentrations des cytochromes de mitochondries hépatiques de rats normaux et thyroïdectomisés exprimées en nmoles par mg de protéine.

Cytochromes	Normaux	Thyroïdectomisés
a	0,273	0,277
b	0,194	0,172
c + c ₁	0,348	0,365

Les valeurs sont les moyennes de 3 mesures, 3 animaux ayant été utilisés pour chacune. La méthode de détermination des cytochromes est décrite dans le texte.

III - Activité de la monoamine oxydase

Les activités monoamine oxydasiques des mitochondries hépatiques de rats normaux et thyroïdectomisés ont été comparées. La figure 9 rend compte des différences d'activité dans les deux états thyroïdiens. Lorsqu'elle est exprimée en μMO_2 consommées par minute, on constate qu'elle est proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée dans le milieu. De plus les mitochondries isolées d'animaux hypothyroïdiens oxydent plus activement la tyramine utilisée comme substrat. Ce résultat confirme les observations de plusieurs chercheurs (94)(95).

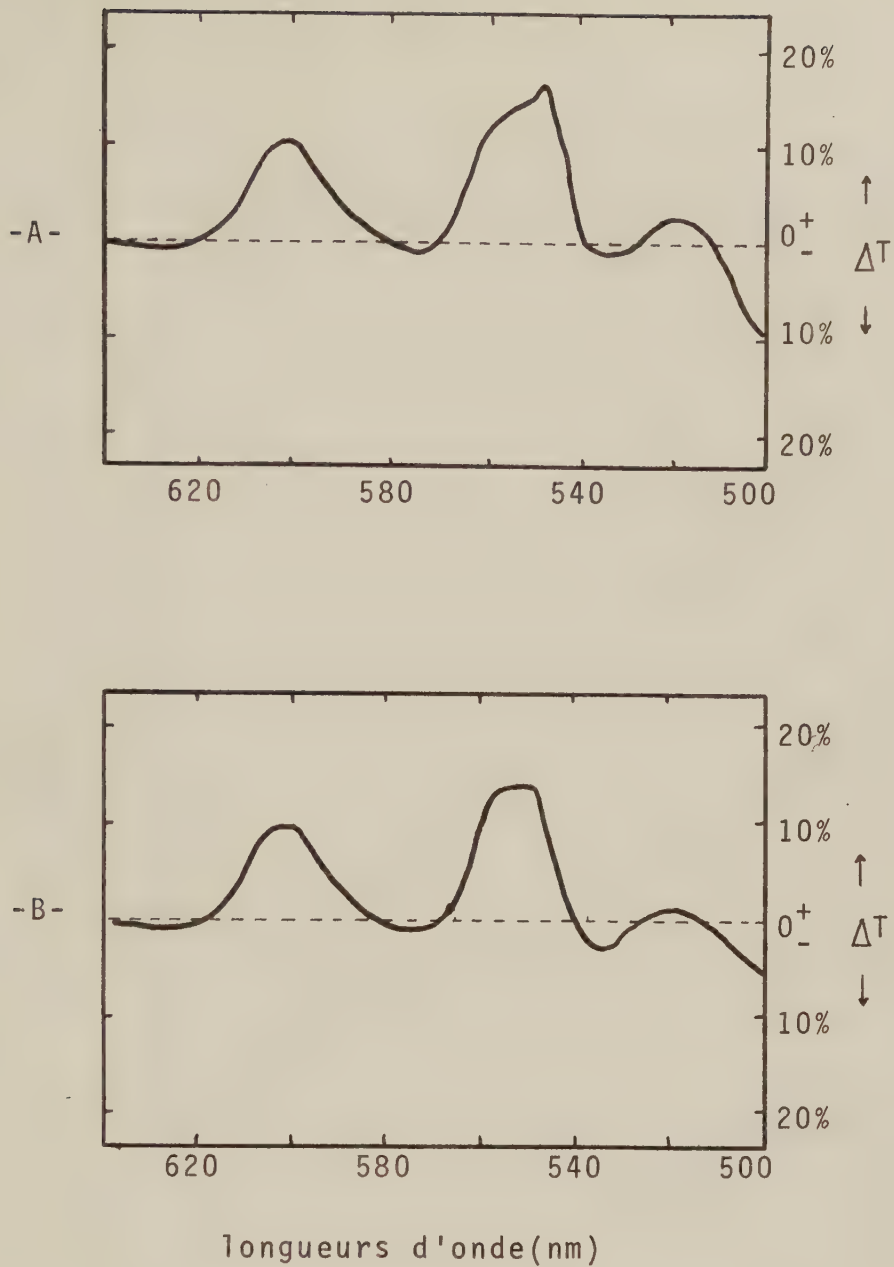


Figure 8 -Enregistrements des spectres différentiels des cytochromes a,b,c et c_1 de mitochondries hépatiques de rats, (formes réduites contre formes oxydées).

A-rats normaux, concentration en protéines dans la cuve 17mg/ml

B-rats hypothyroïdiens, concentration en protéines dans la cuve 17,5mg/ml.

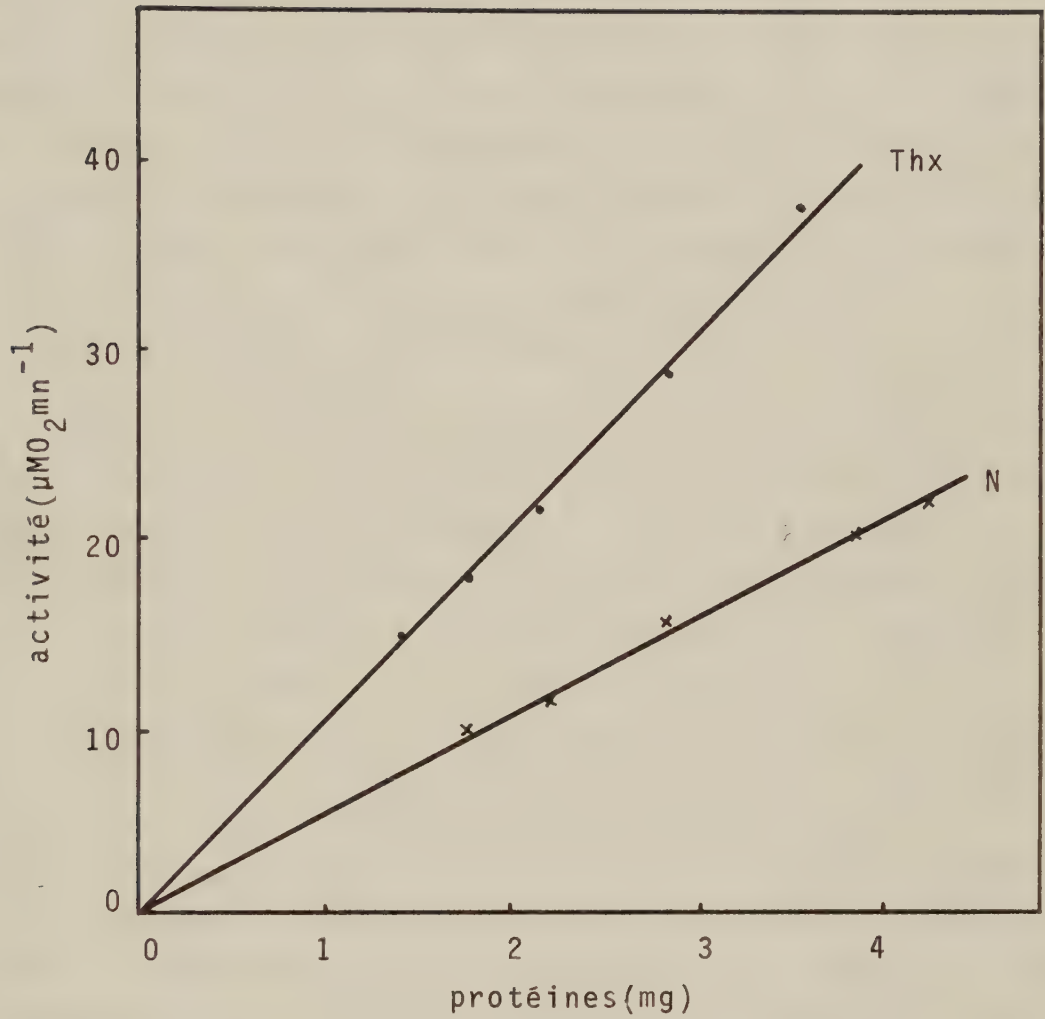


Figure 9-Activité enzymatique de la monoamine oxydase en $\mu\text{M O}_2$ par minute (ordonnée) en fonction de la quantité de protéines mitochondriales en mg, source d'enzyme (abscisse).

Discussion et conclusions

L'ensemble de notre travail confirme certaines données antérieures, à savoir que les mitochondries hépatiques isolées d'animaux hypothyroïdiens respirent plus faiblement que celles de sujets normaux (86)(96). Un tel phénomène se manifeste également lorsqu'il s'agit d'organites isolés de rein et de cœur.

Les agents découplants classiques comme le 2-4-dinitrophénol (DNP) activent la respiration des mitochondries placées dans l'état 4, c'est à dire en présence de substrat seul (97) (98). Comme les hormones thyroïdiennes endogènes chez un sujet normal provoque le même effet, on peut donc les considérer comme possédant une activité découplante. Des expériences réalisées en perfusion, donc dans des conditions proches du fonctionnement biologique mitochondrial, ont mis en évidence l'activité découplante des hormones thyroïdiennes puisque l'abaissement du pH qui caractérise une diminution de la phosphorylation de l'ADP, apparaît sans que des changements dans la vitesse de consommation de l'oxygène soient décelables (99)(100).

Le phénol nitré à faible dose ne modifie pas sensiblement la consommation d'oxygène des mitochondries placées dans l'état 3, c'est à dire en présence d'ADP, ou même le stimule légèrement (101). Par contre les phénols iodés glandulaires diminuent le contrôle respiratoire des mitochondries en présence de β -hydroxybutyrate, mais ne le modifient pas en présence de succinate comme substrat. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de MALEY et LARDY (102) si l'on considère les index de contrôle respiratoire déterminés avec le β -hydroxybutyrate, et conformes à ceux de VOLFIN, KAPLAY et SANADI et de BRONK en présence de succinate (54) (103). Ces faits ont été obtenus avec une quantité égale de mitochondries par essai, mais il en est de même lorsque l'on opère en présence de quantités variables déterminant une vitesse respiratoire semblable dans l'état 4.

Il est intéressant de noter que les quantités de cytochromes ramenées au mg de protéines sont voisines dans les deux

états thyroïdiens. Il ne semble donc pas que l'on puisse rapporter directement les effets des hormones thyroïdiennes sur l'activité de la chaîne respiratoire à une synthèse accrue de ses supports protéiques multienzymatiques.

Nos résultats mettent donc en évidence une action directe des dérivés iodés qui agiraient vraisemblablement au niveau des étapes de conservation de l'énergie. Ils indiquent également que le mode d'action hormonale est plus complexe que celui des découplants types et pourrait affecter le fonctionnement de la partie de la chaîne respiratoire située au niveau du NAD et du coenzyme Q, donc du premier site de conservation de l'énergie.

Nous avons observé une diminution de l'activité de la monoamine oxydase de rats normaux par rapport à l'enzyme des hypothyroïdiens. La monoamine oxydase est localisée au niveau de la membrane externe des mitochondries. Elle ne fait donc pas partie des enzymes des oxydophosphorylations qui se trouvent dans la membrane interne. La membrane externe est relativement dépourvue de perméabilité sélective (11) puisqu'elle permet le passage de substances de poids moléculaire peu élevé et même de certaines protéines, telles que l'apoenzyme du cytochrome c. D'autres protéines ne franchissent pas cette barrière et se lient à la membrane, or il semble que ce soit le cas pour la monoamine oxydase. Un travail récent (104) a montré que celle-ci se fixe sur les phospholipides acides de cette membrane, car elle est extraite sous forme de complexe lipido-protéique dont elle est séparée par les solutions salines. Comme on sait que l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales dépend de leurs liens avec les phospholipides (105)(106), il est possible qu'il en soit de même pour la monoamine oxydase.

La rétention lipidique particulièrement importante dans le foie d'animaux hypothyroïdiens se répercute vraisemblablement au niveau mitochondrial. On peut donc penser qu'indirectement l'activité de l'enzyme varie avec la quantité de

phospholipides acides de la membrane externe. Ainsi peut s'expliquer que l'activité de l'enzyme soit plus élevée chez le rat thyroïdectomisé et qu'aucune action in vitro de T_4 ou T_3 soit observée (66), ainsi que nous l'avons d'ailleurs confirmé.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'ETAT THYROIDIEN SUR LA BIOSYNTHESE DES DIVERS CONSTITUANTS PROTEIQUES SUBCELLULAIRES DE RATS

L'incorporation in vivo des acides aminés radioactifs dans les protéines mitochondriales a fait l'objet de différents travaux (107)(101) qui ont montré que les fractions associées à la membrane interne sont les sites protéiques qui fixent le plus rapidement les amino-acides. Ces données ont été acquises avec des rats normaux (17)(40). Il ne semble pas que des travaux semblables aient été étendus à des rats hypothyroïdiens, bien que l'on sache que la croissance de ces derniers est considérablement ralentie et que leurs mitochondries isolées ne fixent que plus lentement in vitro les acides aminés marqués (86).

Afin d'étudier l'action des hormones iodées sur la régulation de la synthèse protéique chez le rat normal et thyroïdectomisé nous avons comparé les vitesses de renouvellement de divers constituants protéiques subcellulaires. Nos recherches ont principalement été orientées vers les effets de ces hormones au niveau mitochondrial, mais dans tous nos essais des mesures comparatives ont été effectuées avec les fractions microsomales, nucléaires et les protéines plasmatiques. Nous avons déterminé la quantité de L-leucine radioactive retenue au cours du temps par les fractions subcellulaires hépatiques et rénales après une seule injection de l'acide aminé à des rats se trouvant dans différents états thyroïdiens.

I - Mode opératoire

a - Préparation des animaux

Nous avons utilisé des rats albinos Wistar mâles. Une partie de ces animaux est thyroïdectomisée à 60g environ par une méthode chirurgicale. Ceux qui ne sont pas opérés constituent les lots témoins. Pour simplifier l'exposé nous dénommerons les rats témoins et thyroïdectomisés respectivement par N et Thx. Un délai de cinq semaines après l'ablation de la glande est nécessaire pour l'installation de l'hypothyroïdie. Celle-ci est vérifiée par détermination du métabolisme basal et en suivant l'évolution pondérale des animaux. Les administrations d'acide aminé marqué sont réalisées par voie intrapéritonéale. Un minimum de 5 rats est utilisé pour chaque essai.

Les animaux sont sacrifiés à des temps différents, leurs foies prélevés sont rassemblés et les mitochondries isolées. Pour chaque essai la qualité de la préparation mitochondriale est vérifiée (figure 10).

b - Séparation des constituants mitochondriaux

La méthode de fractionnement que nous avons adoptée est celle de BEATTIE et collaborateurs (17). Elle est basée sur la solubilité différentielle de divers composants mitochondriaux. Ces auteurs montrent que chacune des fractions isolées constitue une entité biochimique définie. On obtient successivement les protéines hydrosolubles, une fraction riche en cytochrome c, la protéine dite contractile, les protéines structurales et une fraction renfermant les cytochromes a, b et c_1 .

La réalisation pratique comporte en premier lieu un choc osmotique provoquant la rupture des membranes mitochondriales. Pour cela les particules sont reprises avec de l'eau bidistillée pendant 5 minutes à 30°C. Les protéines hydrosolubles constituées surtout par les déshydrogénases malique et glutamique passent en solution. Une centrifugation pendant 10 minutes à 27.000g (Servall réfrigérée) permet l'isolement de cette fraction soluble.

Le culot résultant est remis en suspension dans une solution KCl 0,9% et l'ensemble est maintenu à 30°C pendant 5 minutes. Un tel traitement extrait le cytochrome c constituant la deuxième fraction qui est récupérée par une centrifugation à 17.300g pendant 10 minutes. Le culot est traité de façon semblable avec du KCl 0,6M pendant 10 minutes à 30°C. On obtient ainsi après centrifugation à 27.000g pendant 10 minutes la protéine contractile. Une petite quantité de cytochrome c résiduel passe dans cette troisième fraction.

Le précipité de cette dernière centrifugation est remis en suspension dans 1ml d'eau bidistillée. Sur une partie aliquote en général 0,1ml, on procède au dosage des protéines dans les conditions indiquées précédemment. On ajoute alors par mg de protéines : 2mg de desoxycholate de sodium, 1mg de cholate de sodium et 0,75mg de lauryl-sulfate de sodium. L'addition de ces produits provoque la solubilisation presque complète des protéines. On ajoute enfin à 1ml de la solution protéique quelques mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ cristallisé et de K_2CO_3 . La solution est ensuite amenée à 13% de saturation avec une solution saturée et neutralisée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La protéine dite structurale précipite. On l'isole par centrifugation 34.800g pendant 10 minutes (centrifugeuse Beckman-Spinco, modèle L, rotor 50). Le surnageant après sédimentation de la fraction précédente est amené à 50% de saturation avec la solution $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Une dernière centrifugation à 17.300g pendant 10 minutes permet de séparer la dernière fraction désignée sous le terme de "fraction des cytochromes".

Dans certaines expériences nous avons seulement séparé les fractions protéiques "KCl-solubles" et "KCl-insolubles". Les protéines de la fraction KCl-soluble sont celles extractibles par une solution de KCl 0,9%, celles de la fraction KCl-insoluble sont le résidu de la précédente extraction (108).

c - Purification des protéines (109)

Les mitochondries entières et les fractions isolées sont traitées avec une solution d'acide trichloracétique telle

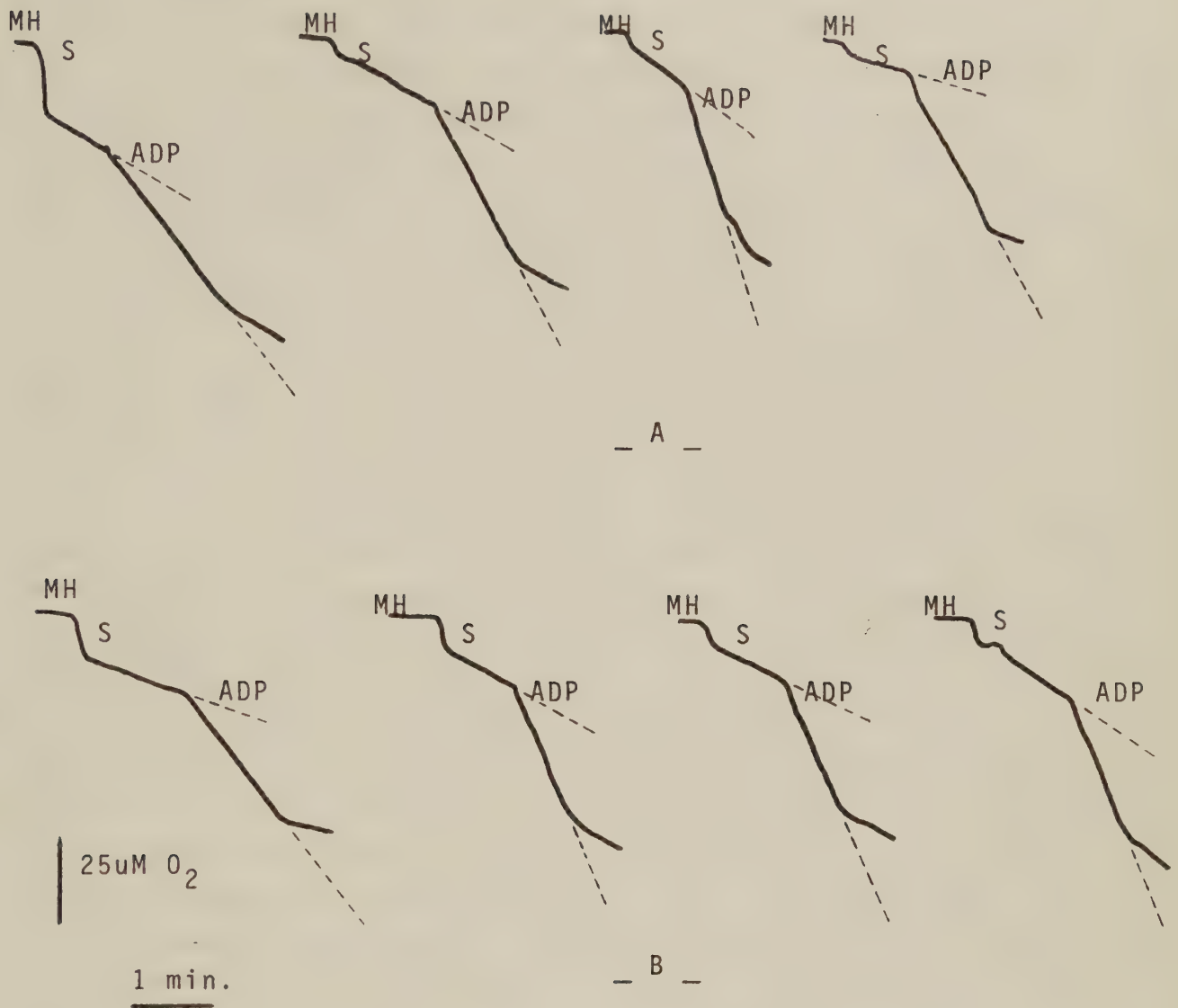


Figure 10 -Contrôle oxygraphique des mitochondries utilisées pour l'analyse des divers constituants protéiques marqués par la L-leucine ¹⁴C.

A=Normaux

B=Hypothyroïdiens

MH=Mitochondries hépatiques

S=Succinate

que la concentration finale obtenue soit de 5%. Les protéines totales mitochondriales d'une part et les protéines de chacune des fractions d'autre part sont ainsi précipitées. Chaque tube est centrifugé à 1.500g pendant 10 minutes (centrifugeuse Jouan réfrigérée G-60). Durant toute cette purification les centrifugations sont conduites avec cet appareil et dans les mêmes conditions. Les surnageants sont éliminés au moyen d'une tubulure branchée sur une pompe à vide. Trois lavages successifs avec une solution de CCl_3COOH à 5% sont effectués, les deux premiers à froid, le troisième à chaud. Cette dernière opération est faite à 90°C pendant 15 minutes. Les protéines sont ensuite dissoutes dans 2ml de NaOH 0,4M contenant 2mg de l'acide aminé qui a été injecté, et maintenues ainsi 20 minutes. Les solutions sont traitées avec CCl_3COOH à 20% de telle sorte que la concentration finale en cet acide soit de 10%. Afin d'assurer une précipitation totale les tubes sont agités avec précaution à l'aide d'un appareil Vortex.

Chaque précipité est extrait d'abord par de l'éthanol à 95° contenant 10% de CH_3COOK et enfin par un mélange éthanol-éther (3/1) à 60°C pendant 5 minutes. Ainsi toutes les substances solubles dans ces solvants et principalement les lipides sont éliminées. Les culots résultant de la dernière centrifugation sont minutieusement séchés et repris dans un volume connu de NaOH N. Une partie de la solution est destinée au dosage des protéines, une autre à la détermination de la radioactivité.

d - Isolement des membranes mitochondriales hépatiques

Nous avons préparé les membranes interne et externe mitochondriales par la méthode décrite par PARSONS(10)(110). Un poids de foie d'environ 20g et provenant en général de 5 ou 6 rats est utilisé. Les mitochondries sont isolées par la méthode de BEATTIE décrite dans le premier chapitre (62). Le culot mitochondrial subit donc 4 lavages, afin d'améliorer le degré de pureté de la préparation. Une partie de la suspension mitochondriale est conservée pour les dosages et

les contrôles biochimiques. L'autre partie est mise en suspension lentement et en agitant dans un tampon phosphate 20mM (pH7,2) contenant 0,02% (P/V) de sérum albumine bovine. Les mitochondries provenant d'un poids de foie d'environ 35g sont ainsi reprises dans 100ml de tampon, et y sont maintenues pendant 20 minutes. Ce milieu hypotonique provoque un choc osmotique modéré qui entraîne la séparation de l'enveloppe externe et sa libération. Cette méthode ne soumet pas les particules à un traitement trop violent qui pourrait entraîner la rupture des liaisons de faible énergie qui maintiennent les structures mitochondriales et ainsi provoquer une redistribution des protéines. La membrane externe est ensuite concentrée par centrifugation différentielle. La suspension est centrifugée pendant 20 minutes à 35.000g (centrifugeuse Servall réfrigérée, Rotor SS34). Les culots sont repris dans un même volume de tampon sans albumine et réhomogénéisés au potter à la main. La plupart des éléments de la membrane interne sont enlevés par centrifugation à 1.900g pendant 15 minutes. Le sédiment obtenu, formé de l'ensemble membrane interne plus matrice est ensuite purifié sur gradient de saccharose comme il sera précisé ultérieurement. Le surnageant est prélevé avec une seringue et centrifugé à 35.000g pendant 20 minutes. La membrane externe sédimente alors. Ce culot ainsi qu'une partie de celui provenant de la centrifugation à 1.900g, est repris dans 5ml du tampon phosphate 20mM. Les suspensions sont homogénéisées au potter. Cinq ml de ces homogénats sont déposés au sommet d'un gradient discontinu de saccharose comprenant 3 couches de 6, 10 et 6ml de solutions de saccharose respectivement à 51,3, 37,7 et 23,2% (P/V). Les centrifugations sont faites à 65.000g pendant 90 minutes dans une centrifugeuse Beckman-Spinco, Modèle L-rotor SW25.

On obtient deux couches, une supérieure C_1 riche en membrane externe, une inférieure riche en membrane interne C_2 et un culot C_3 renfermant la presque totalité de l'ensemble membrane interne plus matrice (figure 11). La couche C_2 est assez largement contaminée par des éléments de la membrane externe.

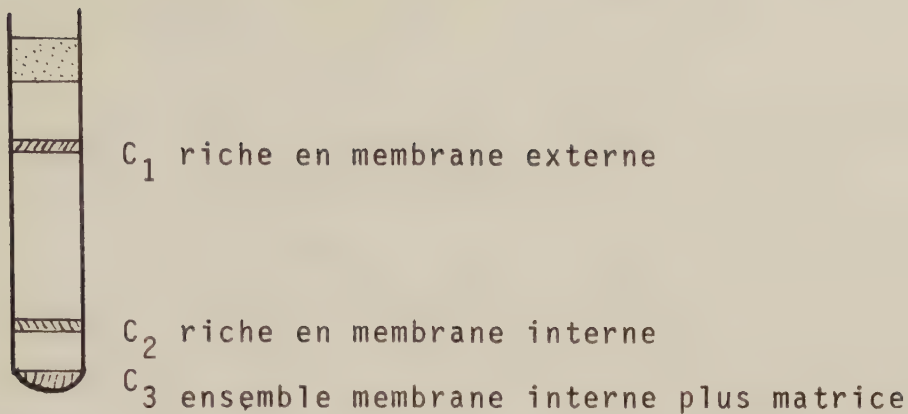


Figure 11 - Répartition des fractions mitochondriales dans le gradient de saccharose.

Les couches C₁ et C₂ sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur dont l'extrémité est recourbée. Ces suspensions sont diluées 6 fois avec de l'eau distillée et centrifugées à 35.000g pendant 40 minutes. Les sédiments de membranes sont enfin repris dans du saccharose 0,25M (0,5ml au maximum). Le culot C₃ est directement réhomogénéisé dans le saccharose 0,25M.

e - Mesure de la radioactivité (111)

- La détermination de ¹⁴C et de ³H est effectuée sur les fractions protéiques et sur les mitochondries entières. Les fractions protéiques solubilisées après isolement et purification sont utilisées directement. Pour les mitochondries une dissolution préalable dans le plus petit volume possible de NaOH N est nécessaire. La radioactivité est mesurée par scintillation liquide.

Aux solutions dans NaOH N on ajoute alors soit 1ml de soluté, soit successivement 3ml d'hyamine, 1ml d'éthanol absolu, 0,2ml d'acide acétique pur. A l'une ou l'autre de ces préparations on additionne 10ml de toluène renfermant 0,5% de 2-5-diphényl-oxazole et 0,05% de 1-4bis-2(4méthyl-5phényl oxazolyl)-benzène. Un flacon témoin contenant 0,1ml de NaOH N et tous les réactifs est préparé afin de déterminer le mouvement propre. Les

comptages sont faits dans un compteur à scintillation du type Packard-Tricarb.

f - Détermination des vitesses de renouvellement des constituants protéiques

La vitesse de renouvellement des constituants protéiques est déterminée soit en suivant la disparition biologique en fonction du temps d'un acide aminé marqué, injecté en une seule dose (112), soit en pratiquant la méthode du double marquage (113). Cette dernière méthode permet d'estimer les vitesses relatives de renouvellement des différentes espèces protéiques. Au lieu d'établir une courbe de décroissance à l'aide de plusieurs points expérimentaux, ce qui implique pour chacun l'isolement des fractions protéiques, nous avons retenu une technique grâce à laquelle deux points à des temps différents peuvent être identifiés sur la même fraction provenant des mêmes animaux.

Une forme isotopique d'un acide aminé (^{14}C) est d'abord administrée plusieurs jours avant le sacrifice des animaux, 6 jours dans nos expériences. Ce premier isotope permet donc de suivre la décroissance biologique des molécules marquées. Puis 24 heures avant le sacrifice des animaux une seconde forme isotopique de l'acide aminé (^3H) est injectée. Le nombre de désintégrations correspondant au ^3H représente le point initial, ceux dûs au ^{14}C le point de décroissance biologique. On calcule le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$. Les fractions protéiques se renouvelant à la même vitesse auront des rapports semblables. Une expérience identique est réalisée en inversant les injections des formes isotopiques, ^3H d'abord, ^{14}C ensuite.

Les résultats obtenus lors des deux types d'essais ont toujours concordé. Si ce procédé ne permet pas de mesurer les vitesses absolues du renouvellement, elle fournit néanmoins des indications sur les vitesses relatives de différentes espèces protéiques. Ainsi nous avons comparé les vitesses de renouvellement des protéines de divers organites subcellulaires provenant d'animaux normaux et d'animaux présentant des déficiences hormonales.

II - Résultats

Des essais préliminaires ont été réalisés chez des rats normaux afin de préciser les conditions dans lesquelles nous désirons effectuer nos expériences définitives.

Des lots de 3 rats de 150g environ ayant reçu 5uCi de ^{14}C -L-leucine uniformément marquée (311mCi par mmole) sont sacrifiés aux 5^{ème}, 13^{ème} et 21^{ème} jours après l'injection de l'acide aminé marqué. Les mitochondries sont isolées et fractionnées comme il est décrit précédemment, la radioactivité pour chaque fraction étant ramenée au mg de protéine. Les résultats sont traduits par des courbes qui représentent le nombre d'impulsions par minute et par mg de protéine en fonction du temps. **La figure 12** rend compte des valeurs obtenues sur les mitochondries entières, les protéines solubles, la fraction riche en cytochrome et la protéine dite contractile. Les résultats sont semblables à ceux obtenus par FLETSCHER et SANADI (39) d'une part, et par BEATTIE d'autre part (40). Les différentes fractions isolées se renouvellent à la même vitesse.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons utilisé des animaux thyroïdectomisés et leurs témoins; 80 rats ont été nécessaires, 50 sont thyroïdectomisés à 60g environ et 30 sont conservés pour constituer les lots témoins. Les animaux sont pesés régulièrement et sur chaque série (N et Thx) une courbe de poids est établie (figure 13). Après 30 jours et avant d'administrer l'acide aminé marqué, nous avons effectué un tri des animaux dans chaque groupe en fonction des valeurs de la détermination du métabolisme basal. Ainsi 25 rats sont choisis dans chacune des 2 séries. On injecte à chaque animal 10uCi de ^{14}C -L-leucine uniformément marquée d'activité spécifique 311mCi par mmole, chacun étant placé dans une cage individuelle, des précautions étant prises pour éviter toute contamination radioactive. Les animaux sont sacrifiés à des temps différents, le sang et les foies prélevés sont rassemblés et les organites cellulaires sont isolés. Pour chaque essai la qualité de la préparation mitochondriale est vérifiée (figure 10).

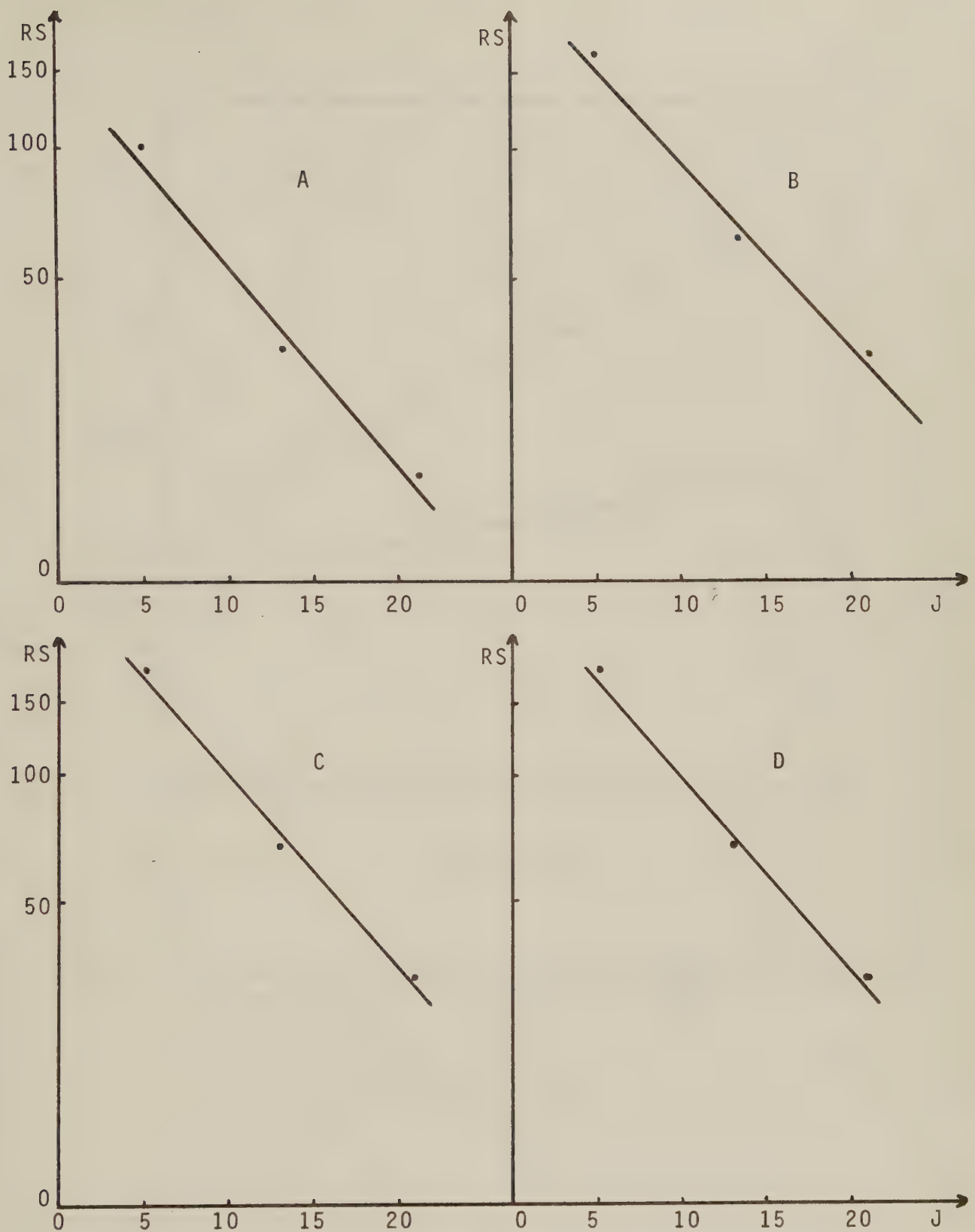


Figure 12 - Courbes obtenues à partir de constituants protéiques mitochondriaux hépatiques de rats normaux et représentant la radioactivité exprimée en nombre de coups par minute et par mg de protéine (RS) en fonction du nombre de jours (J) après l'injection de ^{14}C -L-leucine (coordonnées semi-logarithmiques).
 A=protéines totales B=protéines solubles
 C=cytochrome c D=protéine contractile

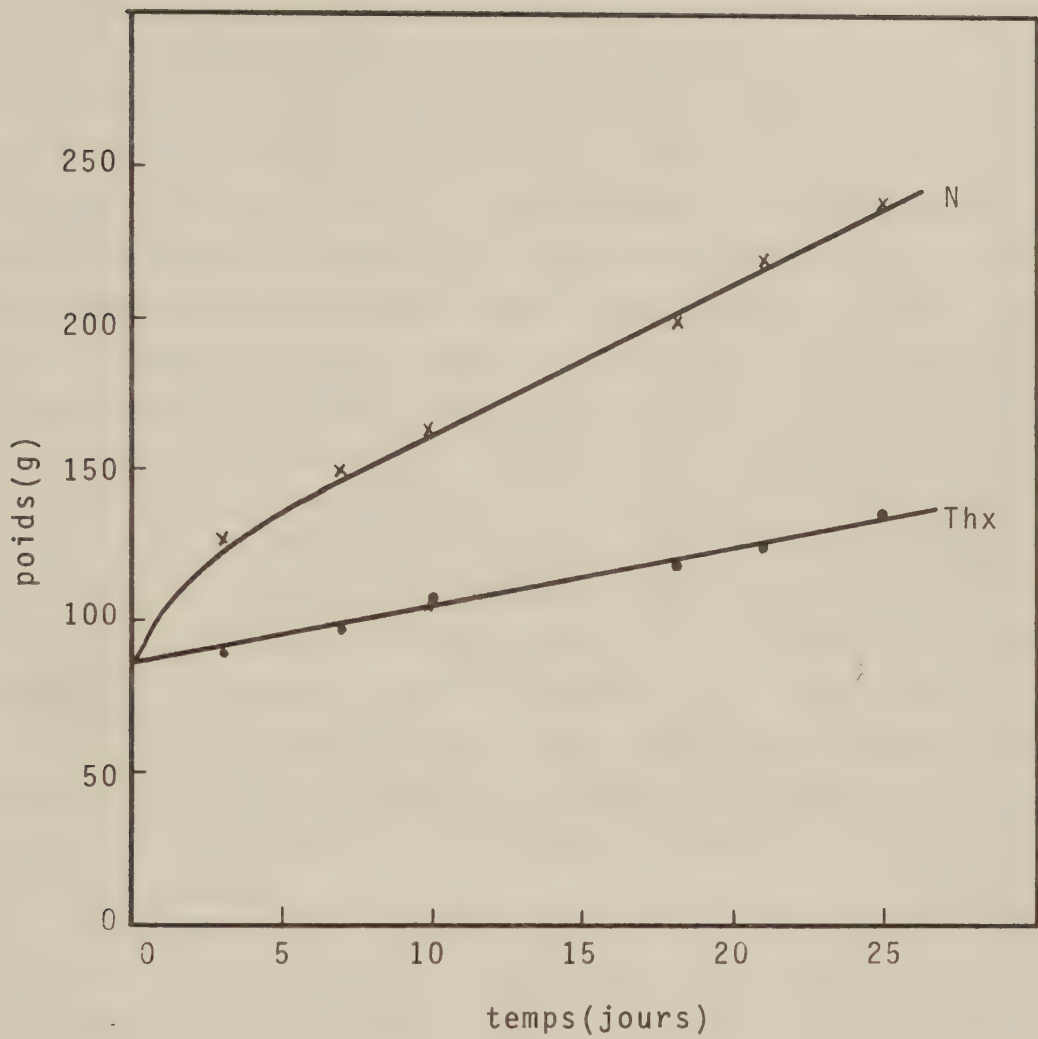


Figure 13 - Courbes de poids des lots d'animaux recevant une injection unique de ^{14}C -L-leucine.

N=rats normaux

Thx=rats thyroïdectomisés

Ces recherches nous ont permis de suivre comparativement l'incorporation de la ^{14}C -L-leucine dans différentes fractions protéiques chez des sujets normaux et hypothyroïdiens, et de déterminer leurs vitesses de renouvellement. Des séries de 5 animaux sont sacrifiées à des temps différents, indiqués sur les figures 14, 15 et 16 qui représentent la radioactivité en nombre de coups par minute et par mg de protéine en fonction du temps en coordonnées semi-logarithmiques. On peut observer en premier lieu que pour les protéines totales, les protéines solubles (figure 14), les protéines structurales et les cytochromes des membranes (figure 15) isolées d'animaux normaux, on obtient une disparition biologique diphasique. On peut mesurer en fait deux demi-vies, une d'environ 5,5 jours correspondant à la période de temps allant jusqu'au 14^{ème} jour, et une de 13 jours correspondant à la composante lente des courbes et calculée pour l'intervalle de temps compris entre le 15^{ème} et le 28^{ème} jour. Les graphiques obtenus avec les mêmes fractions protéiques provenant des animaux hypothyroïdiens sont linéaires et permettent de mesurer une demi-vie d'environ 14,5 jours.

Les représentations graphiques pour les fractions riches en cytochrome c et protéine contractile sont linéaires. Les demi-vies calculées sont d'environ 8,5 jours pour les rats normaux et de 14 jours pour les hypothyroïdiens. Il semble donc que dans un état thyroïdien donné, toutes les protéines mitochondriales isolées se renouvellent avec la même vitesse, que ces fractions soient sous le contrôle du DNA nucléaire ou du DNA mitochondrial. Mais l'état thyroïdien influence fortement le renouvellement des composants protéiques étudiés puisque l'hypothyroïdie accroît la période de renouvellement. Au contraire cet état hormonal n'a pratiquement aucun effet sur la vitesse de renouvellement des protéines nucléaires, microsomales et plasmiques. Seuls les processus de biosynthèse et de dégradation des protéines du surnageant final paraissent ralentis (figure 15).

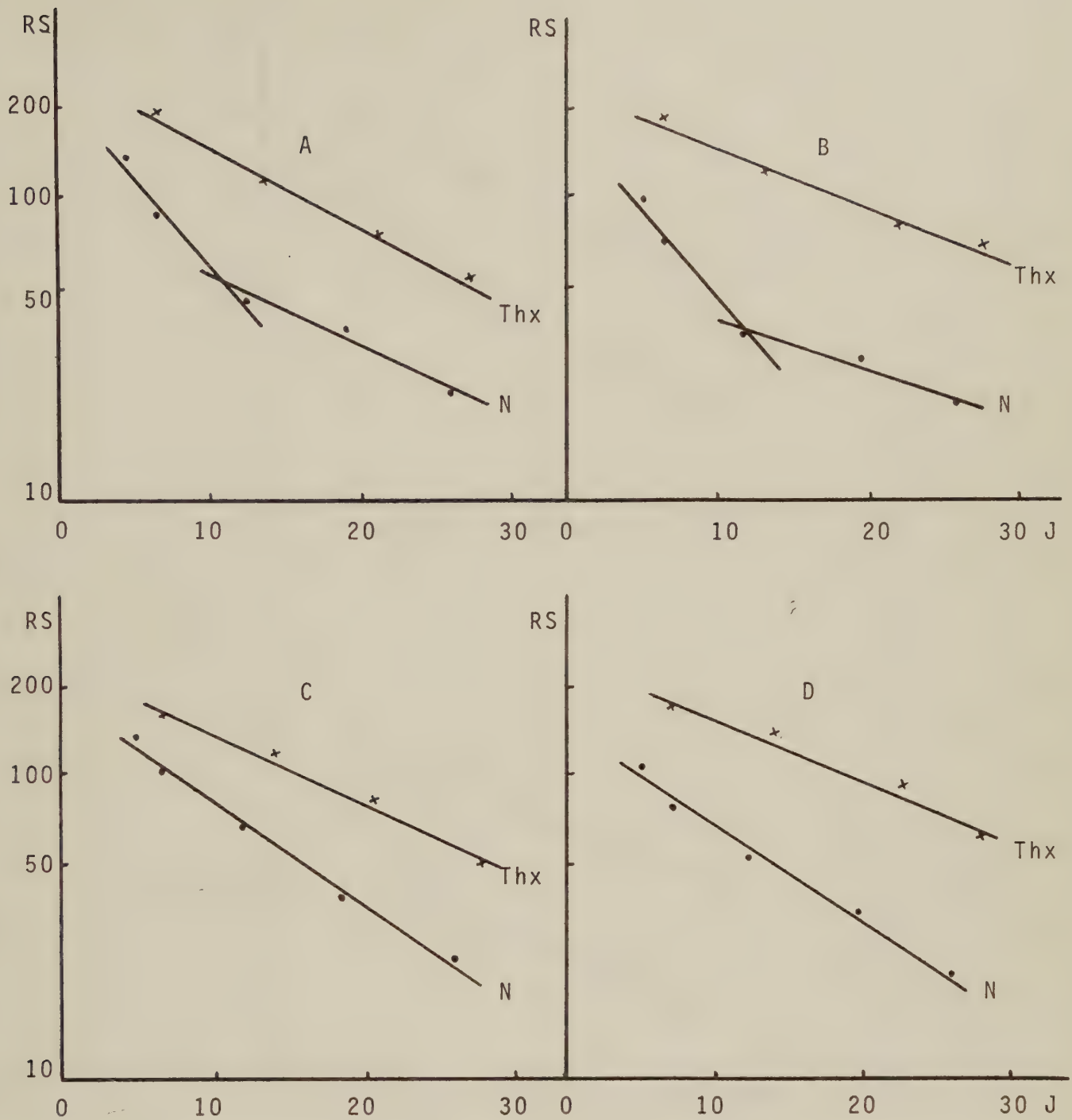


Figure 14 -Variations de la radioactivité spécifique(RS) des fractions protéiques mitochondriales exprimées en nombre de coups par minute et par mg de protéine en fonction du nombre de jours(J)-(Coordonnées semi-logarithmiques).

A=protéines totales	B=protéines solubles
C=cytochrome c	D=protéine contractile
N=rats normaux	Thx=ratsthyroïdectomisés

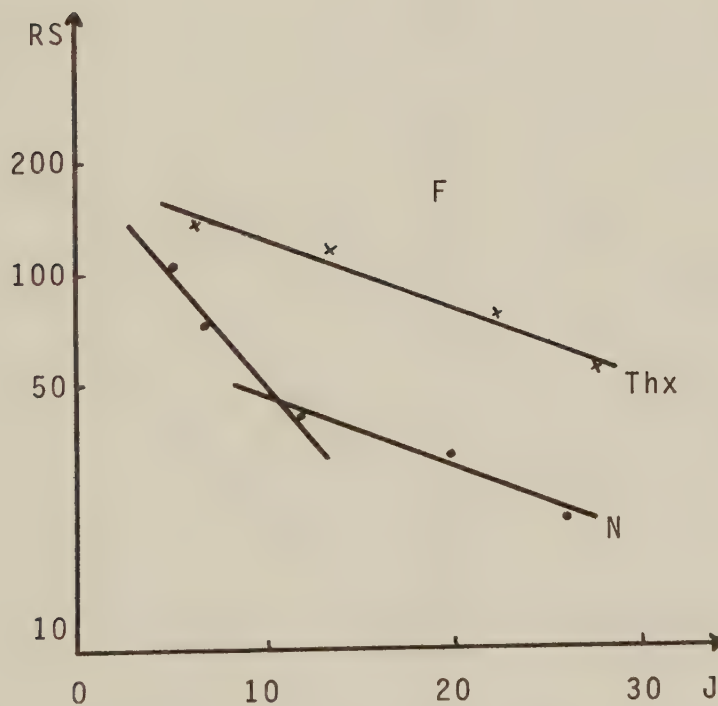
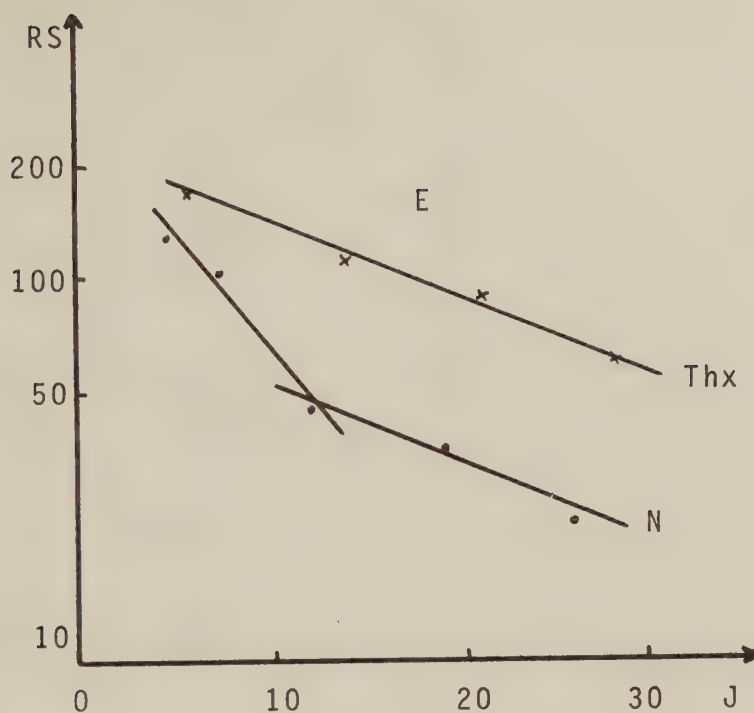


Figure 15 -Variations de la radioactivité spécifique(RS) des fractions protéiques mitochondriales exprimées en nombre de coups par minute et par mg de protéine en fonction du nombre de jours(J). Coordonnées semi-logarithmiques.

E=protéines structurales

F=cytochromes membranaires.

N=rats normaux

Thx=rats thyroïdectomisés

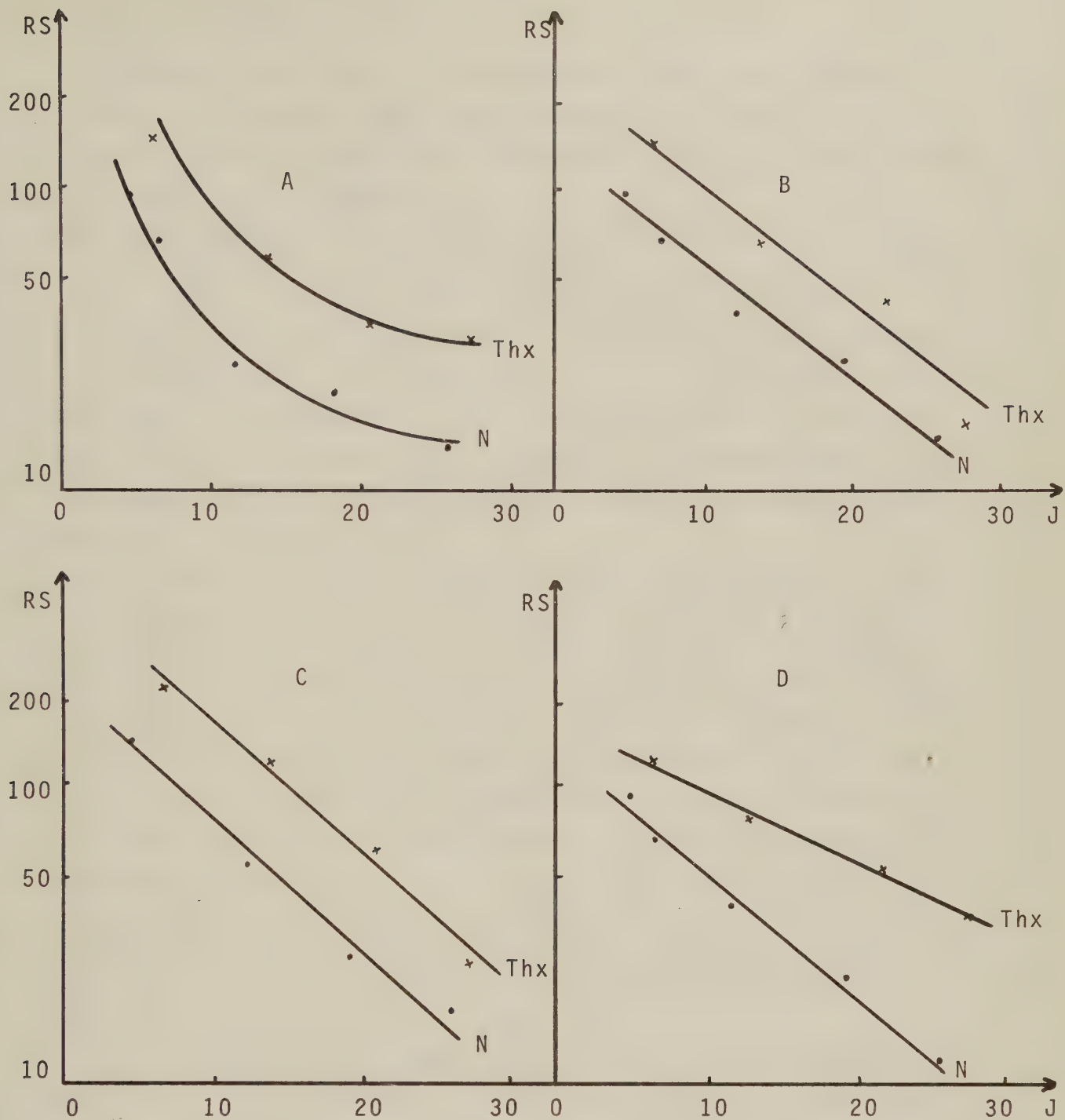


Figure 16 -Variations de la radioactivité spécifique(RS) des fractions subcellulaires hépatiques exprimées en nombre de coups par minute et par mg de protéine en fonction du nombre de jours(J). Coordonnées semi-logarithmiques.

A=Noyaux

B=Microsomes

D=Surnageant des microsomes

Les variations de la radioactivité spécifique des protéines plasmatiques ont été déterminées à titre comparatif.(C).

N=normaux

Thx=thyroïdectomisés

Dans une autre série d'expériences nous avons comparé les vitesses de renouvellement des protéines des mitochondries entières et de celles de leurs membranes interne et externe, des microsomes et des noyaux.

Dans une première série d'essais des lots de 6 rats normaux et thyroïdectomisés depuis 5 semaines reçoivent 5uCi de ^{14}C -L-leucine (70mCi par mmole) par 100g de poids corporel, les animaux étant sacrifiés à des temps différents (1 à 8 jours). Dans une seconde série, réalisée à l'aide de la technique de double marquage, des animaux reçoivent respectivement 6 jours et 1 jour avant d'être sacrifiés, 3,75uCi de ^{14}C -L-leucine (151mCi par mmole) et 50uCi de ^3H -L-leucine (2Ci par mmole) par 100g de poids corporel.

La figure 17 rapporte les résultats traduisant la disparition biologique de la ^{14}C -L-leucine en fonction du temps; ceux obtenus par la méthode de double marquage sont rassemblés dans le tableau 11. Dans les deux cas on constate que la thyroïdectomie ralentit de façon très significative la vitesse de renouvellement des protéines plasmatiques, de celles de la membrane interne mitochondriale et à un degré moindre des constituants de la mitochondrie totale, alors que peu de changement se manifeste avec les autres fractions subcellulaires étudiées. Les résultats concernant les protéines du plasma sont en contradiction avec ceux que nous avons obtenus au cours de l'expérience précédente (figure 16). Ce point sera envisagé dans la discussion.

L'hypothyroïdie ne semble pas affecter notablement les mécanismes de biosynthèse et de dégradation de la membrane externe mitochondriale, des noyaux et des microsomes. De même les protéines des mitochondries entières de rein se renouvellent avec la même vitesse dans les deux états thyroïdiens étudiés.

III - Discussion et conclusions

FLETSCHER et SANADI ont émis une hypothèse selon laquelle

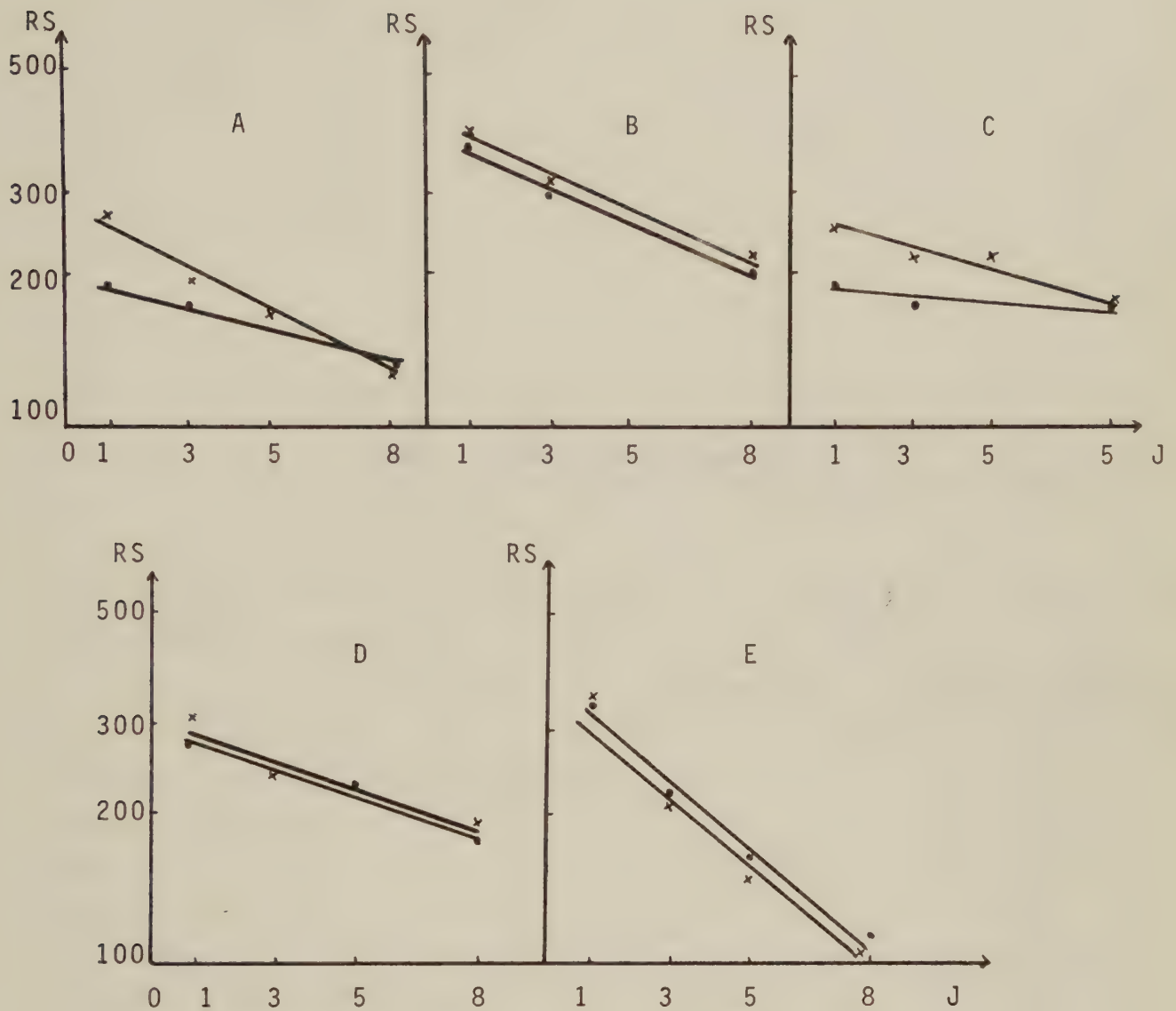


Figure 17 -Variations de la radioactivité spécifique de la ^{14}C L-leucine exprimée en coups par minute et par mg de protéine en fonction du temps (en jours).
Coordonnées semi-logarithmiques.
x — x rats normaux • — • rats thyroïdectomisés
A=protéines totales mitochondriales hépatiques
B=membrane externe " "
C=membrane interne " "
D=protéines totales mitochondriales de rein
E=protéines nucléaires hépatiques

Tableau 11 - Renouvellement relatif des diverses fractions subcellulaires déterminé par la méthode du double marquage.
(Conditions expérimentales précisées dans le texte).

Fractions protéiques	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
	Normaux	Thyroïdectomisés
Hépatiques		
Protéines totales mitochondriales	2,3	1,9
Membrane externe	2,8	2,7
Membrane interne	2,1	1,4
Noyaux	4,7	4,4
Microsomes	3,7	3,3
Surnageant des microsomes	3,0	2,7
Sanguines		
Protéines plasmatiques	5,1	3,6

la mitochondrie se renouvelle comme une entité (39).BEATTIE reprit ultérieurement cette conception l'étayant avec des données obtenues avec la mitochondrie hépatique (40).

Nos essais préliminaires réalisés avec des animaux normaux et dans les mêmes conditions que ces auteurs fournissent des résultats comparables aux leurs puisque toutes les fractions protéiques mitochondriales ont une même vitesse de renouvellement (figure 12).

L'examen des courbes de décroissance reportées sur les figures 14, 15 et 16 permet de faire un certain nombre d'observations. Le résultat le plus évident est un effet net des hormones thyroïdiennes sur la vitesse de renouvellement des constituants protéiques mitochondriaux, puisque leurs demi-vies mesurées chez les animaux thyroïdectomisés est nettement plus élevée. Par contre les iodothyronines endogènes ralentissent peu ou pas le renouvellement des protéines nucléaires et microsomales. Le deuxième point concerne la régulation de la biosynthèse et de la dégradation de ces éléments protéiques et par conséquent la biogénèse de la mitochondrie. Les courbes de décroissance du cytochrome c et de la protéine contractile sont linéaires tant chez les animaux normaux que chez les hypothyroïdiens. Il s'agit dans ce cas de fractions très enrichies en une seule espèce protéique.

Mais nous sommes en mesure de déterminer en première approximation deux demi-vies pour certaines unités protéiques isolées de rats normaux. La décroissance de la radioactivité traduite en coordonnées semi-logarithmiques n'est pas linéaire et n'est donc pas l'expression d'une fonction exponentielle. Ces représentations caractérisent des fractions constituées de plus d'un composant protéique et qui peuvent être envisagées comme des sous-fractions dont la radioactivité décroît suivant des cinétiques de premier ordre, chacune ayant une demi-vie propre (114). LUSENA et DEPOCAS ont obtenu des demi-vies de 5 jours pour les protéines mitochondriales indiquant clairement l'existence de composants à renouvellement rapide (115). De même SWICK utilisant comme marqueur des protéines la guanidine-¹⁴C-arginine qui permet d'éliminer

la réutilisation probable de l'isotope (43), trouve également des demi-vies de 5 jours en moyenne et pour certaines enzymes, telles que l'ornithine aminotransférase et l'alanine aminotransférase des valeurs inférieures à 1 jour (116). La d-aminolévulinate synthétase, une enzyme trouvée dans le compartiment matriciel (117), se renouvelle avec une demi-vie de 70 minutes seulement (44). Les valeurs des demi-vies un peu plus élevées en général que nous avons trouvées sont certainement dûes au fait que nous avons injecté la L-leucine dont la réutilisation isotopique intervient. DRUYAN a montré l'influence de cette réincorporation sur la détermination des vitesses de renouvellement dans le cas de la ^{14}C -L-leucine. En effet les cytochromes b etc présentent des demi-vies de 8 jours environ lorsque la ^{14}C -L-leucine est le marqueur, alors qu'elles ne sont que de 6 jours avec la guanidine ^{14}C -arginine (118). Cette dernière valeur est d'ailleurs retrouvée lorsque l'on injecte un précurseur marqué non plus de la partie protéique mais de sa fraction hémique, à savoir le d-amino(2-3- $^3\text{H}_2$) levulinate qui est très spécifique.

Mais compte tenu du ralentissement du renouvellement des protéines chez l'hypothyroïdien, cette réutilisation du marqueur est sans doute moins importante. On peut donc penser que dans nos études comparatives, la réutilisation isotopique provoque principalement une augmentation des demi-vies des fractions isolées à partir des animaux normaux. Cet inconvénient est donc en notre défaveur et permet de supposer que les écarts enregistrés entre les divers états thyroïdiens doivent être plus importants.

Si la mitochondrie se renouvelle comme une unité, les cinétiques d'incorporation de l'isotope devraient être semblables à celle d'une protéine pure et tous les éléments devraient présenter des vitesses de renouvellement identiques. De nombreux travaux indiquent une hétérogénéité dans les vitesses de certaines fractions mitochondriales protéiques et lipidiques (119) (120) (40). Néanmoins nos premiers résultats ne nous permettent pas d'infirmer l'hypothèse de FLETCHER et SANADI, car il semble que la majeure partie des composants protéiques mitochondriaux

se comportent de façon identique quant à leur biosynthèse et leur dégradation d'une part, et leur sensibilité à l'action des hormones thyroïdiennes d'autre part.

Différentes études ont montré que la biosynthèse des protéines des membranes mitochondriales est indépendante. En effet des mitochondries isolées incorporent les acides aminés marqués dans leur membrane interne et non dans la membrane externe (121)(122)(123)(124). Ces résultats impliquent une double origine biogénétique des constituants protéiques mitochondriaux et donc un transfert de protéines préformées vers les structures mitochondriales comme l'ont mis en évidence plusieurs auteurs (125)(126). Une différence dans l'origine biogénétique des membranes mitochondriales doit se refléter dans le renouvellement de ces composants. De plus une régulation indépendante de la synthèse et de la dégradation de ces deux membranes apparaît lorsque l'on détermine les vitesses relatives de leur renouvellement. La membrane externe se renouvelle beaucoup plus vite que la membrane interne (64)(45)(42). L'hypothyroïdie amplifie cette différence, puisque la demi-vie de la paroi externe ^{reste} voisine de celle des témoins normaux alors que le renouvellement des éléments protéiques liés à la membrane interne est encore ralenti. Il semble que les hormones thyroïdiennes n'influencent pas sensiblement l'intensité des mécanismes métaboliques des protéines de la membrane externe mitochondriale, du noyau et des microsomes, donc des constituants subcellulaires protéiques qui sont sous le contrôle de l'ADN nucléaire (127). Par contre la régulation de la synthèse des protéines de la membrane interne, qui sont vraisemblablement codées par le DNA mitochondrial, est modifiée par l'état thyroïdien. L'effet des hormones thyroïdiennes sur la synthèse des nucléotides a fait l'objet de différents travaux contradictoires. DE LEO considère que seule la synthèse de l'ADN mitochondrial, et non celle de l'ADN nucléaire, est sous le contrôle des hormones iodées, l'ADN-polymérase de cet organite pouvant être impliquée, l'activation de la biosynthèse des ARN mitochondriaux étant consécutive à l'augmentation de la concentration en

ADN (128). La thyroïdectomie ne modifie pas le taux des ARN cytoplasmiques dans des conditions où celui des ARN mitochondriaux est abaissé. Mais d'autres trouvent que l'action hormonale se situe essentiellement au niveau de la synthèse des ARN nucléaires et mitochondriaux par activation des ARN-polymérases, l'enzyme mitochondriale étant stimulée plus précocement (129)(130). Il est évident que si l'effet des hormones thyroïdiennes se manifeste sur la synthèse des structures mitochondriales impliquées dans les oxydations phosphorylantes, la synthèse à la fois des ARN nucléaires et mitochondriaux est nécessaire pour réaliser la formation complète de ces structures.

Nos résultats mettent en évidence le fait que la régulation de la synthèse des membranes mitochondriales s'opère indépendamment, comme on peut le constater lorsque l'état thyroïdien est modifié. Il semble qu'un effet spécifique des hormones iodées se manifeste sur les mécanismes de la biosynthèse et de la dégradation de la membrane interne, ou tout au moins d'une fraction de la mitochondrie comprenant ce composant particulière. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de GROSS (131) (132) qui a montré d'une part que l'effet des hormones thyroïdiennes sur le foie et sur le cœur est d'augmenter sélectivement la masse des membranes internes mitochondriales, et d'autre part que l'hypothyroïdie ralentit de façon identique le renouvellement de certaines protéines liées à la membrane interne et du DNA mitochondrial.

T R O I S I E M E P A R T I E
=====

PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES MITOCHONDRIES ET

BIOSYNTHESE DES CONSTITUANTS PROTEIQUES SUBCELLULAIRES

DE LA SOURIS GENETIQUEMENT NAINES

Les oxydophosphorylations et le métabolisme protéique ont été étudiées chez le rat thyroïdectomisé chirurgicalement. Nous avons étendu ces recherches chez des animaux génétiquement athyroïdiens, comme les souris naines (dwarf)(dw++)(133), qui sont des mutants dont l'adénohypophyse est presque entièrement privée de sécrétions d'hormone somatotrope et de thyroïdostimuline (134)(135)(136). En conséquence ces souris ne possèdent que des îlots diffus de cellules thyroïdiennes.

Dès 1930 SMITH et DOWELL trouvent que la région thyroïdienne est riche en tissus adipeux et fibreux, et qu'il est impossible de mettre en évidence une organisation glandulaire bien définie (137). Les vésicules sont petites et les cellules bordantes paraissent inactives, si l'on se réfère à la hauteur de ces cellules épithéliales comme critère d'activité (138)(139). Elles sont en effet moins hautes que chez les témoins et leurs noyaux sont plus petits avec une chromatine plus dense, ce qui constitue un bon signe d'un ralentissement du métabolisme.

Les souris dw++ nous ont donc paru constituer un bon matériel pour suivre l'influence des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme protéique en présence ou non d'hormone somatotrope, également impliquée dans la croissance et le développement. Ces souris présentent l'avantage sur les animaux hypophysectomisés d'avoir une corticosurrénale fonctionnelle, mais au dessous de la normale, des sécrétions d'hormones gonadotropes bien que l'animal reste stérile (140) et une neurohypophyse en place (141)(142). Seules les hormones somatotrope (STH) et thyroïdostimulante (TSH) font presque entièrement défaut (143). L'hypophyse de la souris naine présente peu de cellules acidophiles à l'examen histologique (144)(145)(146).

Notre travail a comporté en premier lieu une étude comparée des propriétés oxydophosphorylantes et de diverses activités enzymatiques mitochondriales de souris naines et normales, puis nous avons entrepris des recherches sur les effets de l'hormone de croissance et de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine sur la synthèse protéique subcellulaire.

I - Propriétés biochimiques comparées

Nous avons suivi les propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries hépatiques de souris naines dans les mêmes conditions que pour les rats. Nous avons ensuite étudié les activités de la monoamine oxydase et de la cytochrome oxydase, enzymes mitochondriales, et de la NADPH-cytochrome c réductase microsomale (147)(148).

1 - Propriétés oxydophosphorylantes

Les mitochondries sont isolées par la méthode de SCHNEIDER et HOGEBROOM (60). Les vitesses respiratoires dans l'état contrôlé ou état 4 et dans l'état activé ou état 3 sont mesurées par la méthode oxygraphique en présence de deux substrats le succinate 6mM et le B-hydroxybutyrate 14mM. Sur le Tableau 12 sont rassemblées les valeurs moyennes des vitesses respiratoires, des index de contrôle respiratoire et des rapports P/O déterminés lors de 6 essais. La consommation d'oxygène des mitochondries de souris naines avec les deux substrats est abaissée dans l'état contrôlé, mais les index de contrôle respiratoire et les rapports P/O sont à peu près les mêmes pour les souris naines et normales. La consommation d'oxygène est donc abaissée que le milieu soit supplémenté ou non en ADP. La figure 18 qui représente les enregistrements oxygraphiques, illustre ce résultat.

2 - Activités enzymatiques

Les résultats des mesures d'activité de la monoamine-oxydase, de la cytochrome oxydase et de la NADPH-cytochrome c réductase sont rapportés dans le tableau 13.

La monoamine oxydase localisée sur la membrane externe mitochondriale (149), est beaucoup moins active chez la souris naine que chez les témoins. La différence d'activité entre les deux souches d'animaux apparaît nettement sur la figure 19. On peut dès maintenant rappeler que le comportement de cette enzyme chez le rat hypothyroïdien n'est pas le même que celui

Tableau 12 - Vitesses respiratoires de mitochondries hépatiques isolées de souris normales et naines, exprimées en $\mu\text{M O}_2$ par minute et par mg de protéine en présence de Succinate 26mM et de B-hydroxybutyrate 14mM .

Les méthodes de détermination des Index de contrôle respiratoire et des rapports P/O sont indiquées dans le texte.
Les résultats numériques sont les moyennes de 6 expériences, accompagnés de l'écart type.

Substrat	S normales					S dw		
	E ₄	E ₃	RC	P/O	E ₄	E ₃	RC	P/O
Succinate	8,2±0,6	37,4±4,1	4,7±0,7	2,0±0,2	5,7±0,5	23,4±4,1	4,1±0,5	2,0±0,3
B-hydroxybutyrate	2,8±0,2	7,5±1,6	2,6±0,5	2,6±0,3	2,7±0,3	6,4±1,3	2,4±0,4	2,6±0,4

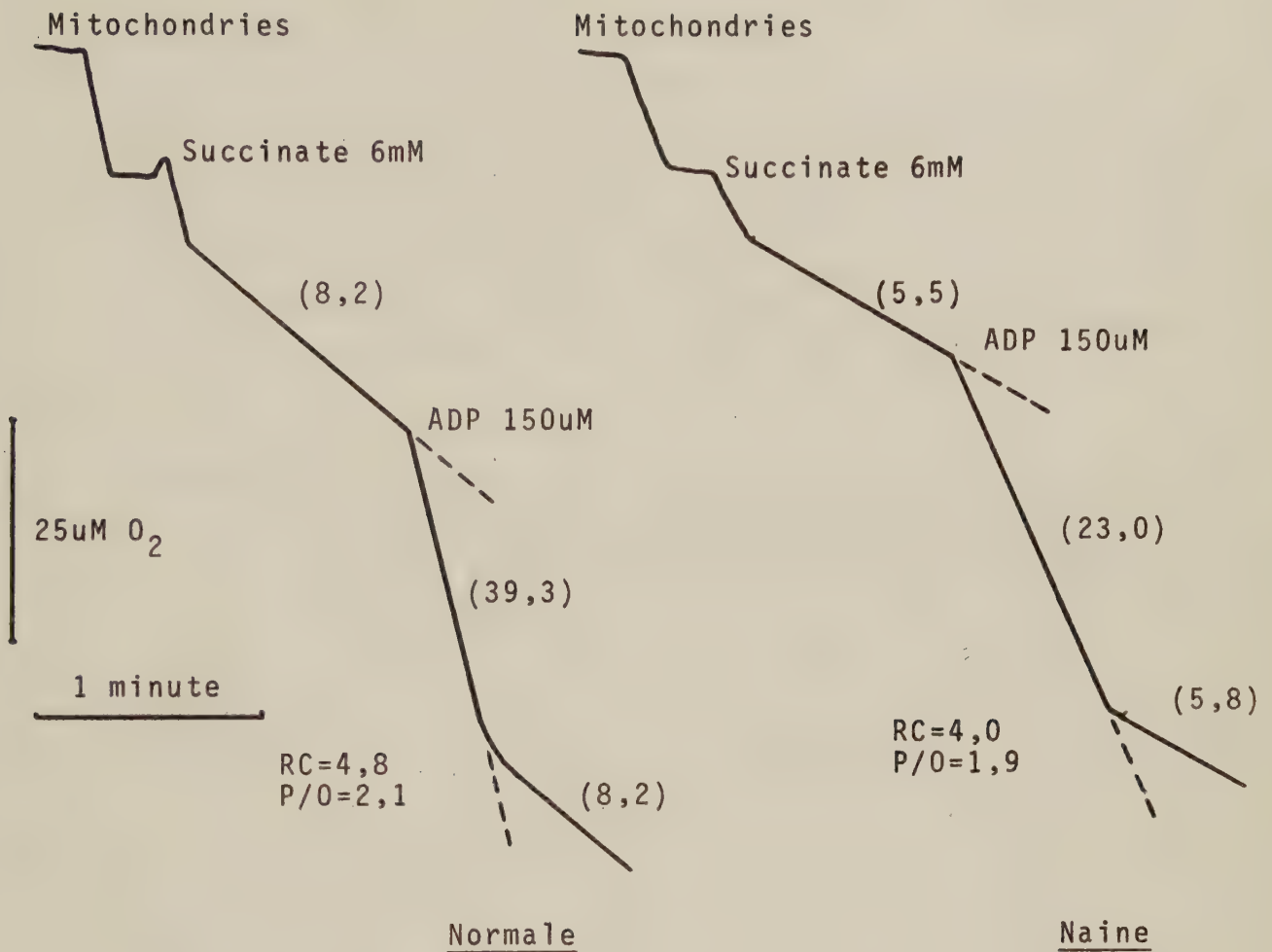


Figure 18 - Enregistrements oxygraphiques de la consommation d'oxygène de mitochondries provenant de souris normales et naines en présence de Succinate 6mM comme substrat.

Entre parenthèses sont représentées les vitesses respiratoires exprimées en $\mu\text{M O}_2$ par minute et par mg de protéine.

observé chez la souris naine, puisque chez le premier elle est activée par rapport au témoin normal.

L'activité de la cytochrome oxydase (150), un composant de la chaîne respiratoire et donc de la membrane interne mitochondriale, est inchangée. Il ne semble donc pas qu'une déficience en STH et en hormones thyroïdiennes influe sensiblement sur l'activité de cette enzyme lorsqu'elle est ramenée au mg de protéine. Il en est de même de la NADPH-cytochrome c réductase, un marqueur spécifique de la fraction microsomale.

Tableau 13 - Activités de la monoamine oxydase, de la cytochrome oxydase et de la NADPH-cytochrome c réductase déterminées chez la souris naine et la souris normale. Les techniques sont décrites dans le texte.
Chaque valeur est la moyenne de 3 mesures.

Enzymes	Souris	
	Normales	Naines
Monoamine oxydase(+)	7,0	3,9
Cytochrome oxydase(+)	158	155
NADPH-cytochrome c réductase(++)	80	82

(+) $\mu\text{M O}_2 \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

(++) nmole de cytochrome réduit $\times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

II - Biosynthèse des composants protéiques subcellulaires

Dans une première série d'expériences nous avons comparé les vitesses de renouvellement des protéines plasmatiques et subcellulaires de souris naines et normales par deux approches expérimentales différentes. Puis nous avons suivi l'incorporation ^{14}C -L-leucine uniformément marquée durant 30 minutes. Enfin des administrations de STH et de 3,5,3',triecto-L-thyroxine aux souris naines, nous ont permis d'analyser les effets

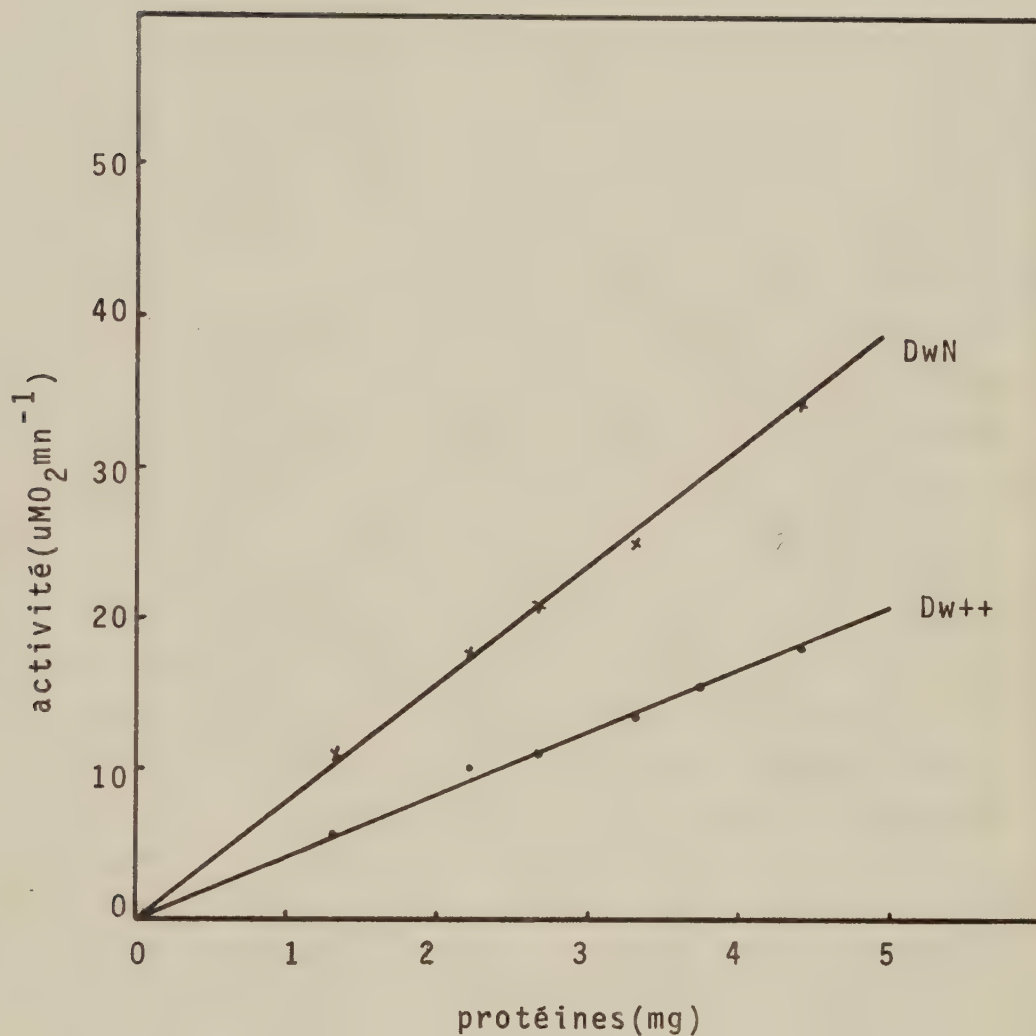


Figure 19 - Courbes représentant l'activité de la monoamine oxydase de suspensions mitochondriales hépatiques de souris naines et normales en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée dans le milieu

DwN=souris normales Dw++=souris naines

spécifiques à chacune de ces hormones sur le métabolisme protéique.

1 - Vitesses de renouvellement

Nous avons suivi la décroissance biologique de la ^3H -L-leucine entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jour après son administration. Dans tous les essais nous avons utilisé comme marqueur protéique la L-leucine, car en plus de sa bonne incorporation sa concentration plasmatique est la même chez la souris naine et chez la normale; 10,6 umoles par 100ml de plasma pour celle-ci et 11,3 pour la première. Nous avons toujours injecté des quantités d'acide aminé proportionnelles au poids de l'animal.

On remarque à l'examen des figures 20 et 21 que le renouvellement protéique est plus lent chez les souris naines, spécialement celui de la fraction insoluble mitochondriale.

Les résultats obtenus par le procédé du double marquage sont rassemblés dans le tableau 14. Dans une première série d'essais les animaux reçoivent respectivement 6 jours et 1 jour avant d'être sacrifiés 10uCi de ^{14}C -L-leucine (151mCi/m mole) et 50uCi de ^3H -L-leucine (2Ci/m mole) par 100g de poids corporel. Dans une seconde série les injections des deux formes isotopiques de la L-leucine sont inversées.

Dans les deux expériences on constate que les résultats sont qualitativement semblables à ceux trouvés par le procédé précédent. Cette approche expérimentale permet en plus de mettre nettement en évidence le ralentissement important du renouvellement des protéines de toutes les fractions isolées, excepté pour les protéines mitochondriales de rein pour lesquelles les écarts sont moins significatifs.

Enfin on peut observer spécialement chez la souris normale qu'il existe des fractions subcellulaires à renouvellement rapide comme cela fut démontré chez le rat (45)(114).

2 - Cinétique d'incorporation de la ^{14}C -L-leucine

Le marquage relativement plus faible des protéines hépatiques et rénales 24 heures après l'injection de l'acide (§-Nous remercions le Professeur LEMONNIER qui a bien voulu effectuer ces déterminations analytiques).

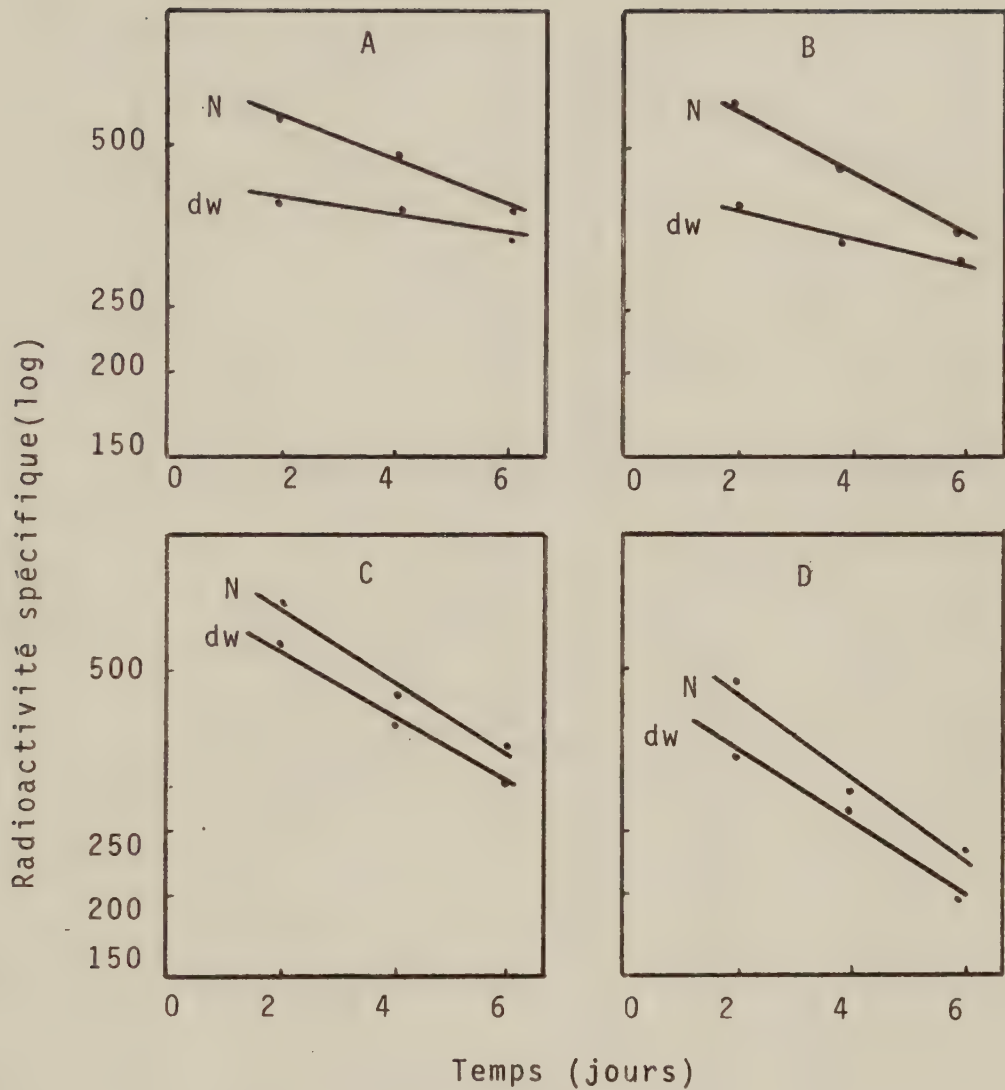


Figure 20 - Variations de la radioactivité spécifique de la ^3H -L-leucine en fonction du temps(en jours), des protéines totales mitochondriales (A), insolubles mitochondriales (B), microsomaux (C) et nucléaires (D) de foie de souris naines et normales. (coordonnées semi-logarithmiques)
N=souris normales
dw=souris naines

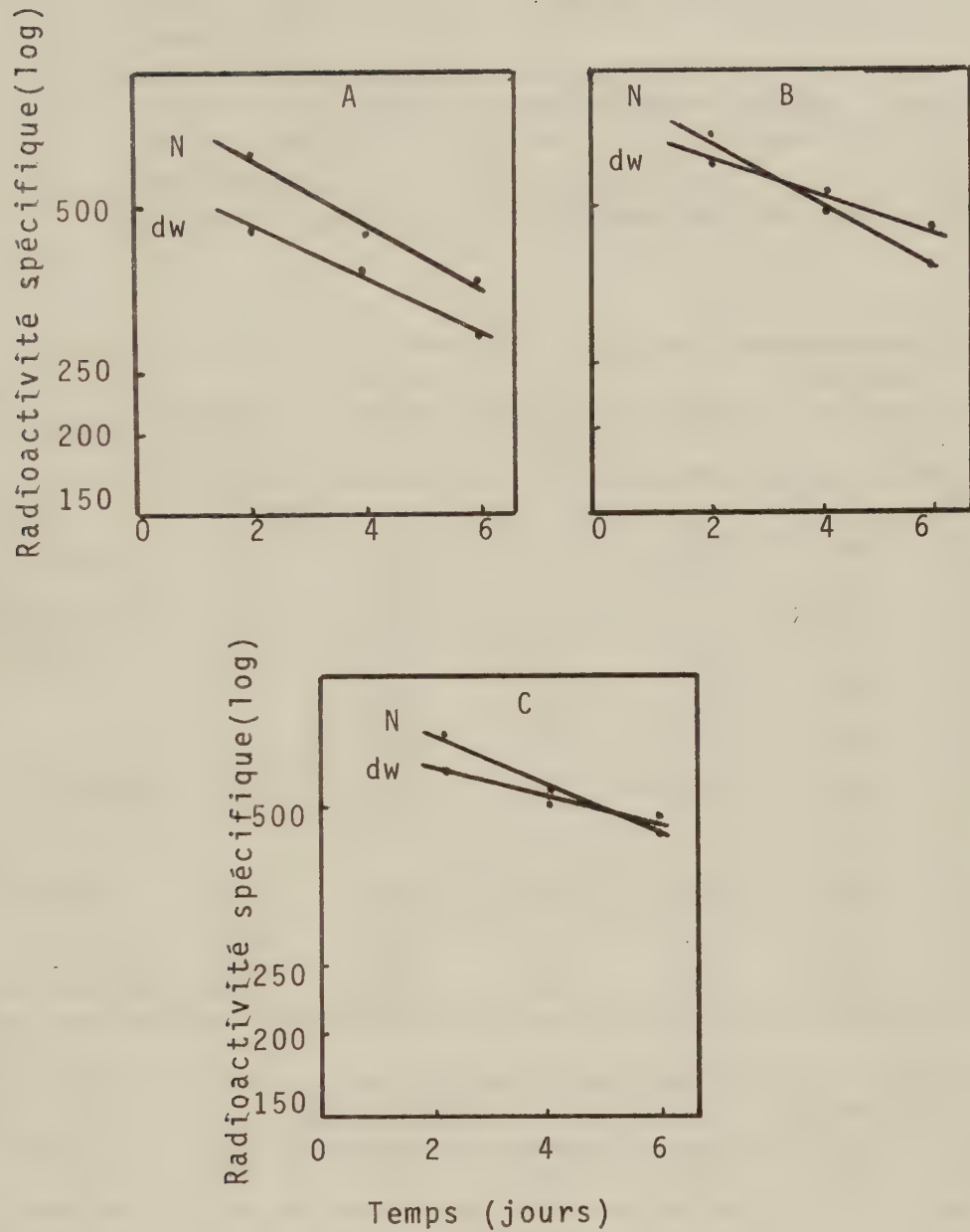


Figure 21 - Variations de la radioactivité spécifique de la 3H-L-leucine en fonction du temps(en jours) des protéines du surnageant des microsomes hépatiques (A), des microsomes de rein (B) et du surnageant des microsomes de rein (C) de souris naines et normales.
(coordonnées semi-logarithmiques)
N=souris normales
dw=souris naines

Tableau 14 - Radioactivité spécifique des fractions subcellulaires hépatiques et rénales de souris naines et normales.

Dans l'expérience A les animaux ont été sacrifiés 1 jour et 6 jours respectivement après l'administration de 3H-L-leucine et 14C-L-leucine.

L'expérience B est identique mais les injections de 3H-L-leucine et 14C-L-leucine ont été inversées.

Expérience A

Fractions subcellulaires	Normales			Naines		
	^{14}C	^3H	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^{14}C	^3H	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
<u>Hépatiques</u>						
Prot.totales mitoch.	390	656	1,7	260	280	1,1
Prot.solubles mitoch.	300	635	2,1	192	220	1,1
Prot.insol. mitoch.	380	594	1,6	246	278	1,1
Noyaux	307	834	2,7	178	338	1,9
Microsomes	332	932	2,8	256	483	1,9
Surnageant des micros.	406	1059	2,3	281	424	1,5
<u>Rénales</u>						
Prot.totales mitoch.	390	510	1,3	320	443	1,4
Microsomes	379	900	2,6	297	603	2,0
Surnageant des micros.	421	950	2,2	380	678	1,7

Expérience B

Fractions subcellulaires	Normales			Naines		
	^{14}C	^3H	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$	^{14}C	^3H	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
<u>Hépatiques</u>						
Prot.totales mitoch.	500	428	1,2	265	305	0,9
Prot.solubles mitoch.	224	147	1,5	260	270	1,0
Prot.insol. mitoch.	455	380	1,2	254	295	0,8
Noyaux	552	226	2,6	386	198	2,0
Microsomes	781	343	2,4	460	291	1,6
Surnageant des micros.	638	344	1,9	371	281	1,4
<u>Rénales</u>						
Prot.Totales mitoch.	450	409	1,1	313	375	0,8
Microsomes	745	352	2,2	548	393	1,4
Surnageant des micros.	740	401	1,9	496	388	1,3

aminé marqué nous a conduit à étudier l'incorporation de la L-leucine chez ces animaux durant une période ne dépassant pas 30 minutes. On remarque en effet sur le tableau 14 que l'incorporation après 24 heures dans les protéines totales mitochondriales de souris normales est de 656 coups par minute et par mg de protéine alors qu'elle ne dépasse pas 280 coups chez la souris dwarf, les mêmes valeurs sont de 932 et 483 pour les microsomes.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les animaux nains et les normaux nous avons injecté des doses d'acide aminé radioactif proportionnelles au poids de l'animal, soit 10 uCi de ^{14}C -L-leucine par 100g de poids corporel. Cette façon d'opérer nous semble valable puisque la concentration plasmatique en leucine est la même chez les souris naines et leurs témoins et que le volume sanguin est généralement proportionnelle au poids corporel. Les particules subcellulaires du foie et du rein sont ensuite isolées 10, 20 et 30 minutes après l'injection de la ^{14}C -L-leucine. Les homogénats tissulaires sont effectués dans des solutions de saccharose contenant 100mg par litre de L-leucine froide afin de réaliser une dilution isotopique suffisante pour provoquer l'arrêt complet de l'incorporation du marqueur.

Sur la figure 22 sont représentées les radioactivités spécifiques en fonction du temps de diverses fractions protéiques. Cette première expérience fut réalisée avec des mitochondries partiellement purifiées. Les corrections ont été effectuées en fonction du degré de contamination microsomale.

Les courbes obtenues lors d'une deuxième expérience, menée avec des organites présentant moins de 3% de contamination microsomale font l'objet des figures 23 et 24. L'incorporation de la ^{14}C -L-leucine est réduite de 15% à 30 minutes dans les microsomes hépatiques, par contre aucun changement n'apparaît dans les autres organites de rein ou de foie et particulièrement dans les fractions mitochondriales. Il semble donc que lorsqu'une dose traceuse d'acide aminé radioactif est utilisée aucune différence sensible dans l'incorporation n'est décelable.

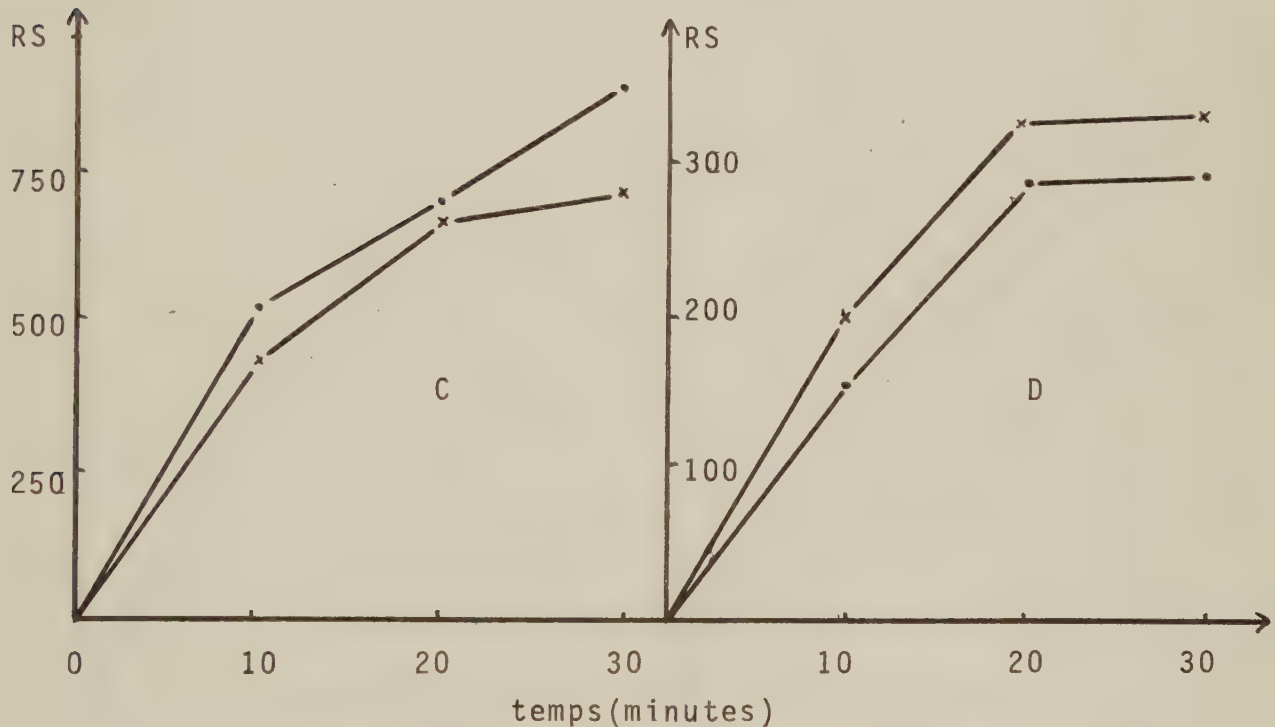
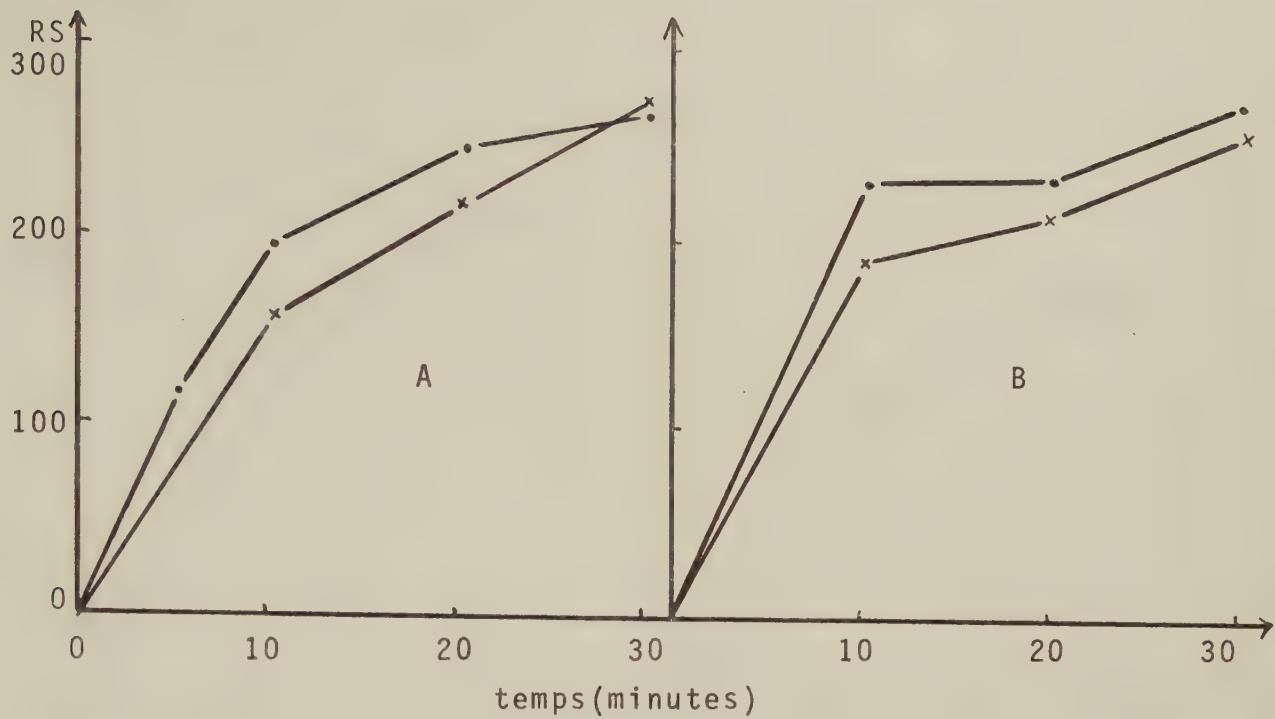


Figure 22 -Variations de la radioactivité spécifique de la ^{14}C -L-leucine en fonction du temps(en minutes) des protéines totales mitochondriales hépatiques (A), insolubles mitochondriales hépatiques (B), nucléaires hépatiques (C) et des protéines mitochondriales de rein(D).

• ——— • souris normales x ——— x souris naines
 RS=Radioactivité spécifique en coups par minute et par mg de protéine. (D).

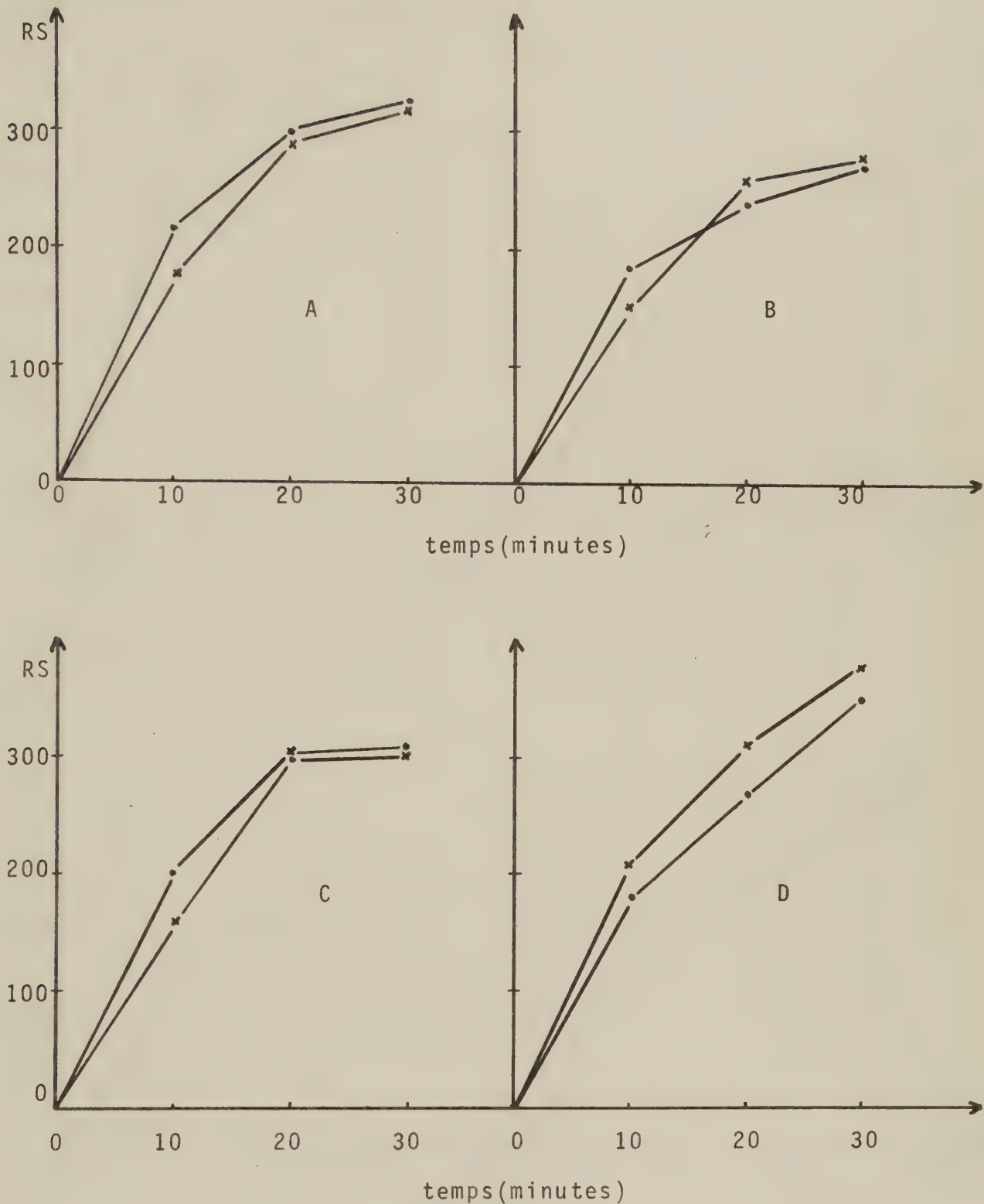


Figure 23 - Variations de la radioactivité spécifique (RS) de la ^{14}C -L-leucine en fonction du temps (en minutes) des protéines totales (A), solubles (B), insolubles (C) de mitochondries hépatiques, et des protéines totales mitochondriales de rein de souris naines et normales

x — x souris naines • — • souris normales
 RS est exprimée en coups par minute et par mg de protéine.

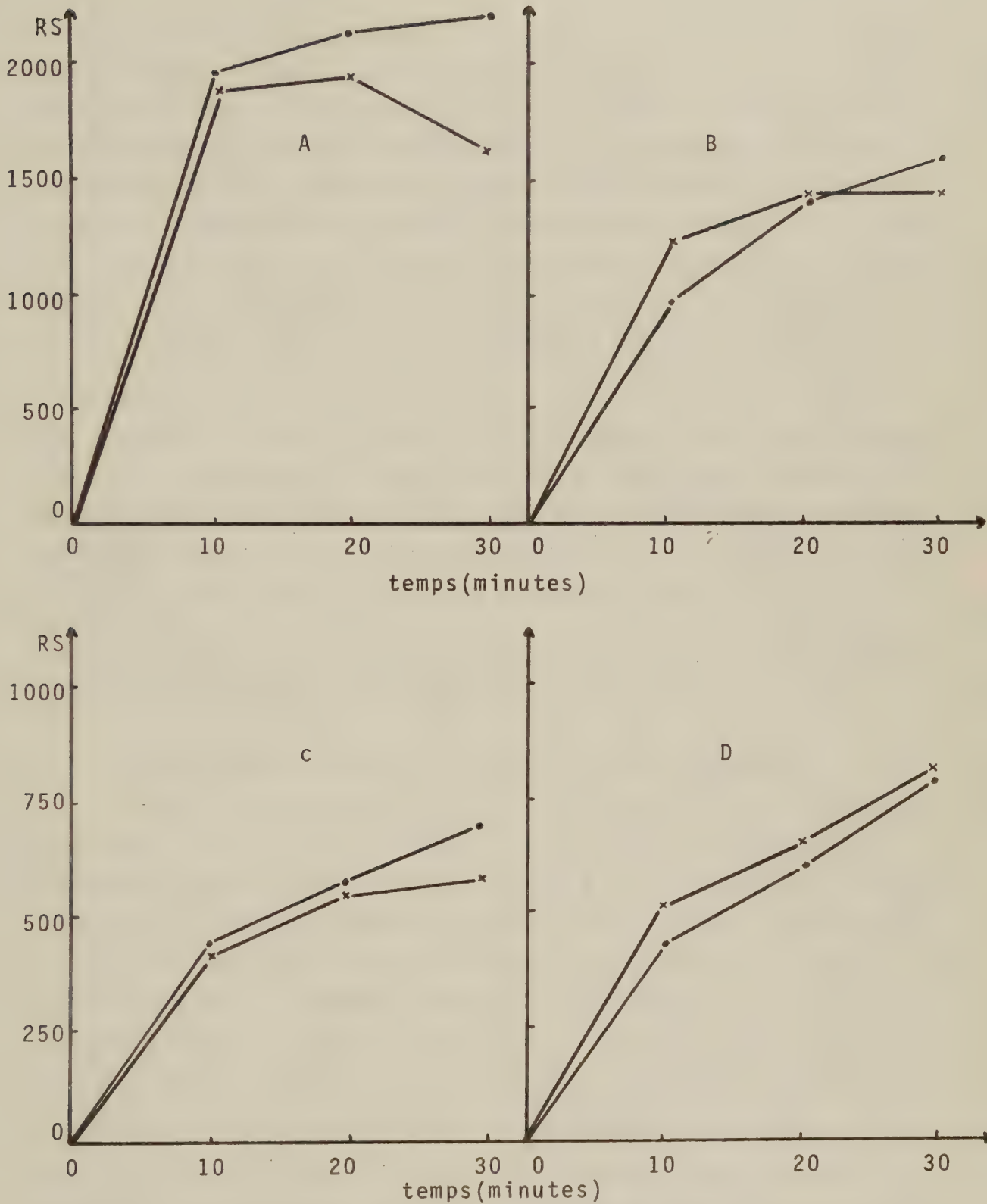


Figure 24 - Variations de la radioactivité spécifique(RS) de la ^{14}C -L-leucine en fonction du temps (en minutes) des protéines microsomales de foie (A) et de rein (B), des protéines du surnageant des microsomes de foie (C) et de rein (D) de souris naines et normales.
 x-----x souris naines •-----• souris normales
 RS est exprimée en coups par minute et par mg de protéines.

Nous avons repris ce travail en injectant aux animaux 100 uCi par 100g de ^3H -L-leucine contenant 5mg de L-leucine stable. Nous avons ainsi administré environ 10 fois la concentration plasmatique en leucine multipliée par le facteur de dilution correspondant aux liquides corporels. Les conditions ainsi réalisées se rapprochent de celles adoptées par KORNER (151) pour des études d'incorporation dans des tissus en perfusion. La radioactivité spécifique des fractions cellulaires hépatiques et rénales est mesurée 10 et 20 minutes après l'injection de la L-leucine. Les valeurs obtenues ainsi que les pourcentages d'incorporation correspondant aux souris naines par rapport aux normales, sont reportées sur le tableau 15. On peut constater que la radioactivité des fractions hépatiques isolées de souris naines est beaucoup plus basse que celles des témoins tant à 10 minutes qu'à 20 minutes. Par contre aucune différence existe pour les constituants protéiques subcellulaires du rein. Pour chaque point 25 souris naines ou 12 souris normales ont été utilisées; on peut donc considérer les variations biologiques individuelles comme peu conséquentes.

3 - Influence de STH et T_3 sur le renouvellement

Nous avons observé chez la souris naine un ralentissement très net du renouvellement des protéines hépatiques. Ce phénomène peut être dû soit à l'absence de STH ou de T_3 , soit au manque des deux hormones. Afin de déterminer le rôle respectif de chacune nous avons procédé au traitement de la souris naine, soit avec l'hormone somatotrope (20mUSP-NIH-S9 GH par animal pendant 18 jours), soit avec la 3,5,3', triodo-L-thyronine (2ug par 100g de poids corporel et par jour pendant 24 jours). Les animaux reçoivent respectivement 6 jours et 1 jour avant d'être sacrifiés 10uCi de leucine- ^{14}C (151mCi/m mole) et 50uCi de leucine- ^3H (2Ci/m mole) par 100g de poids corporel. Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau 16. On remarque en premier lieu l'hétérogénéité des vitesses de renouvellement des diverses fractions subcellulaires des souris

Tableau 15 - Radioactivité spécifique des fractions subcellulaires hépatiques et rénales de souris naines et normales ayant reçu une dose unique de 3H-L-leucine supplémentée en leucine froide.

Sont également représentés les pourcentages de la radioactivité spécifique des fractions protéiques de la souris naine par à celle mesurée chez la souris normale.

Fractions protéiques	Radioactivité incorporée cpm/mg de protéine					
	10 minutes			20 minutes		
	N	dw	%	N	dw	%
Hépatiques						
Protéines totales						
mitochondriales	309	178	57	430	340	79
fraction soluble						
mitochondriale	194	122	63	465	275	58
Fraction insoluble						
mitochondriale	300	170	57	450	300	67
Noyaux	553	349	63	792	491	62
Microsomes	2379	1499	63	3321	2421	73
Surnageant des microsomes	496	370	75	850	547	64
Rénales						
Protéines totales						
mitochondriales	253	263	96	420	-	-
Microsomes	1424	1396	98	2118	2023	96
Surnageant des microsomes	546	557	102	828	900	108

naines témoins. Les rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ sont semblables à ceux obtenus au cours des expériences précédentes et dont les résultats font l'objet du tableau 14. On peut donc distinguer des fractions subcellulaires à renouvellement rapide.

L'administration chronique de STH aux animaux nains ne modifie pas les vitesses de renouvellement. Par contre T_3 semble activer le renouvellement protéique, cet effet se manifestant surtout sur les constituants ayant déjà une vitesse de dégradation élevée.

Tableau 16 - Effets de STH et T_3 en traitement chronique sur les vitesses de renouvellement des protéines subcellulaires et plasmatiques de souris naines (dw). Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

Fractions protéiques	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$		
	dw	dw+STH	dw+ T_3
<u>Hépatiques</u>			
Protéines totales mitochondriales	1,4	1,4	1,8
Noyaux	2,8	2,8	3,2
Microsomes	2,8	2,6	3,7
Surnageant des microsomes	2,3	2,1	3,1
<u>Sanguines</u>			
Protéines totales plasmatiques	2,5	2,3	3,9

Discussion et conclusions

Au cours de ce travail nous avons étudié les propriétés biochimiques de la souris naine (dw), car nous disposions alors d'un matériel biologique très proche de l'animal hypophysectomisé. En effet l'ARN-polymérase de cette souris naine se comporte comme l'enzyme de l'animal privé d'hypophyse (152).

La respiration des mitochondries hépatiques des souris naines en présence de succinate ou de B-hydroxy-butyrat est ralentie dans les états contrôlé et activé par l'ADP en sorte que les index de contrôle respiratoire sont sensiblement les mêmes que chez les animaux normaux et que les rapports P/O ont des valeurs théoriques. Il s'ensuit que le fonctionnement de la chaîne respiratoire chez la souris naine est semblable à celui des hypothyroïdiens. Ces résultats nous permettent d'admettre que la déficience en hormones thyroïdiennes chez la souris naine est sans doute responsable des modifications de l'activité respiratoire. Il ne semble pas que l'abaissement de la respiration mitochondriale chez ces animaux soit dû à une diminution de la synthèse protéique in situ (153). En effet l'activité spécifique de la cytochrome oxydase n'est pas modifiée chez l'animal nain dans des conditions où les vitesses respiratoires, exprimées par mg de protéine sont nettement plus faibles que celles des souris normales. Il est d'ailleurs significatif que l'activité de la NADPH-cytochrome c réductase soit inchangée. Ceci semble impliquer une modification de la masse cellulaire et tissulaire dans ces divers états endocriniens, plutôt qu'un effet spécifique sur ces enzymes.

Au contraire l'activité de la monoamine oxydase, qui est augmentée chez le rat hypothyroïdien, est nettement diminuée chez la souris naine. Ce fait suggère que la déficience en STH peut être responsable de la diminution de la synthèse de cette enzyme, bien que l'on ne puisse éliminer la possibilité d'une fixation différente de la monoamine oxydase sur les phospholipides acides.

Les modifications du métabolisme protéique sont consécutives à l'absence des deux hormones dont dépendent la croissance et le développement. Les sites d'action sont différents pour les iodothyronines et STH. Celle ci stimule l'incorporation des acides aminés dans les protéines seulement en présence d'une quantité de L-leucine égale à 10 fois celle du plasma. Il est vraisemblable que la concentration en acides aminés devienne rapidement limitante et comme le passage intracellulaire des aminoacides dépend de leur concentration dans les liquides extracellulaires (154)&(155), il est possible que STH agisse en facilitant cette pénétration.

L'absence d'effet de STH sur le renouvellement protéique suggère que cette hormone manifeste son action au niveau de l'anabolisme protéique, soit en intervenant sur la biosynthèse des ARN (156), soit en provoquant une pénétration accrue des matériaux nécessaires à l'élaboration des protéines. Si STH paraît jouer un rôle mineur dans le contrôle du renouvellement protéique (157), il n'en est pas de même des hormones thyroïdiennes. Il ressort nettement du tableau 14 que les protéines subcellulaires des animaux normaux se dégradent plus rapidement, ce qui entraîne un renouvellement accéléré de tous ces constituants. Les hormones thyroïdiennes chez l'animal nain affecteraient particulièrement la dégradation des protéines microsomales et plasmatiques lesquelles présentent le renouvellement le plus rapide. Ce résultat peut paraître en contradiction avec celui obtenu chez les rats hypothyroïdiens. Mais en fait nous devons considérer que STH étant aussi absente, l'anabolisme consécutif à la dégradation accélérée est insuffisamment actif, dès lors le phénomène catabolique se trouve stimulé. Il est vraisemblable qu'une coordination des effets des deux hormones est nécessaire au maintien de l'équilibre métabolique protéique.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

=====

Les différentes expériences entreprises soit chez le rat hypothyroïdien, soit chez la souris naine nous ont permis de distinguer l'influence exercée par les iodothyronines et la STH sur la consommation d'oxygène et sur la biosynthèse des divers constituants protéiques. Il semble que l'hormone de croissance ne soit pas un facteur susceptible d'affecter efficacement le fonctionnement de la chaîne respiratoire. La diminution de la consommation d'oxygène des mitochondries isolées chez la souris naine est très vraisemblablement due à l'hypothyroïdie très marquée consécutive à la déficience en TSH. Par contre les effets des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme oxydatif apparaît nettement. Etant donné qu'une réponse rapide des iodothyronines sur la chaîne des transporteurs d'électrons a été mise en évidence (84)(103) et que les différences dans les index de contrôle respiratoire dépendent du substrat utilisé il est difficile d'admettre que les mécanismes des oxydo-phosphorylations affectés par ces substances procèdent uniquement d'un choix dans la synthèse des éléments qui leur servent de sites d'action.

On peut à la lumière de ces faits émettre l'hypothèse que la baisse du métabolisme basal que l'on constate chez le rat hypothyroïdien résulterait d'un ralentissement dans le renouvellement de la mitochondrie elle-même, mais que l'effet découplant des hormones iodées s'exercerait sur celle-ci, quel que soit l'état thyroïdien de l'animal.

Le site d'intervention des phénols iodés et de STH sur le mé-

tabolisme protéique est très différent. L'hormone de croissance est directement impliquée dans la biosynthèse des constituants protéiques alors que les hormones thyroïdiennes contrôlent leur vitesse de renouvellement et plus particulièrement leur catabolisme. On peut donc supposer dans ces conditions que la stimulation de la synthèse des ARN nucléaires et des protéines par les iodothyronines procéderait d'un effet catabolique activé lequel est indispensable au maintien d'un état d'équilibre dynamique.

Nos résultats mettent de plus en évidence le fait que la régulation de la synthèse des membranes mitochondriales s'opère indépendamment. Ils confirment donc indirectement l'hypothèse de l'autonomie fonctionnelle et structurale de la plupart des fractions protéiques localisées dans la membrane interne et qui sont sous le contrôle de l'ADN mitochondrial. Or, comme les iodothyronines stimulent de façon spécifique la synthèse des protéines de cette membrane, laquelle sert de support aux réactions d'oxydophosphorylations, il est probable que les réponses impliquent une intervention hormonale au niveau des acides nucléiques mitochondriaux. Plusieurs travaux sont d'ailleurs en faveur d'une telle hypothèse (128)(130).

L'homogénéité des vitesses de renouvellement de nombreux constituants mitochondriaux (protéines, ADN) dans les divers états thyroïdiens semble indiquer qu'au niveau de cet organite le processus biogénétique est sous la dépendance des iodothyronines. Puisque les concentrations en cytochromes rapportées à un même poids de protéine ne changent pas avec l'état thyroïdien, on peut penser que leur effet est d'augmenter sélectivement la masse des membranes internes mitochondriales et par suite la quantité globale des mitochondries. D'ailleurs GROSS en étudiant les variations d'activité de la succinate-cytochrome c réductase et de la cytochrome oxydase parvient à des conclusions analogues. (158). Il est donc possible que la modification de l'environnement physiologique dûs aux hormones thyroïdiennes entraîne l'apparition d'une nouvelle génération mitochondriale, les particules pré-existantes étant sélectivement dégradées. Une telle

interprétation de nos résultats est en accord avec celle proposée par GROSS.KATYARE a d'ailleurs montré l'existence de divers types de mitochondries, dont l'un est fortement diminué dans l'hypothyroïdie (159).

En conclusion il semble que l'hormone de croissance stimule la synthèse protéique au niveau moléculaire en agissant directement ou indirectement sur l'ARN-polymérase, mais certainement l'effet principal consiste en une augmentation du pool intracellulaire des acides aminés, alors que les hormones thyroïdiennes affectent spécialement le renouvellement biologique des composants subcellulaires et la biogénèse mitochondriale. Il est donc possible que l'effet catabolique des iodothyronines, longtemps considéré comme pharmacologique ou même toxique, ne soit en fait que le reflet d'une action physiologique normale.

Il est encore difficile de déterminer les rapports existants entre ces phénomènes et l'action particulière sur les coenzymes respiratoires, et donc sur la biosynthèse de l'ATP et son utilisation.

B I B L I O G R A P H I E

=====

- 1 - J. TEPPERMAN,
Metabolic and Endocrine Physiology;(1968)Year Book
Medical Publishers Inc. p.20
- 2 - A. KORNER,
Recent Progr. Hormone Res. 21 (1965) 205
- 3 - J. R. TATA,
19th Annu. Symp. Fundamental Cancer Research: Developmental
and Metabolic Control Mechanisms and Neoplasia. p.335
Baltimore: The Williams and Wilkins Co., (1965)
- 4 - J. R. TATA,
Biochem. J. 104 (1967) 1
- 5 - D. B. ROODYN, K. B. FREEMAN et J. R. TATA,
Biochem. J. 94 (1965) 628
- 6 - R. MICHEL,
in : Excerpta Medica International Congress Series 184,
Proc. IIIrd International Congress of Endocrinology
Mexico, D.F., June 30-July 5, 1968.
- 7 - R. MICHEL, J. BOUHNİK et O. MICHEL,
General and Comparative Endocrinology, 15 (1970) 303
- 8 - R. MICHEL, J. BOUHNİK et O. MICHEL,
Compt. Rend. Soc. Biol. 162 (1968) 1915
- 9 - D. F. PARSONS,
Mitochondrial Structure and Compartmentation.
Adriatica Ed. (1967) p.23.
- 10 - D. F. PARSONS, G. R. WILLIAMS; W. THOMPSON, D. WILSON et B. CHANCE,
Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica Ed. (1967) p.29.

- 11 - E.PFAFF,
Mitochondrial Structure and Compartmentation.
Adriatica Ed. (1967)p165.
- 12 - W.C.WERKHEISER et W.BARTLEY,
Biochem.J. 66 (1957) 79.
- 13 - J.B.CHAPPELL et A.R.CROFTS ,
in:J.M.TAGER,S.PAPA,E.QUAGLIARIELLO et E.C.SLATER(Ed.)
Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria.
(BBA Library,Vol.7).Elsevier,Amsterdam (1966)p293.
- 14 - J.B.CHAPPELL et K.N.HAARHOFF,
Biochemistry in Mitochondria,Academic Press (1966)p75.
- 15 - A.L.LEHNINGER,
in MITOCHONDRION,Benjamin Ed.New York,(1964).
- 16 - D.S.BENDALL et DE DUVE,
Biochem.J. 74 (1960) 444.
- 17 - D.S.BEATTIE,R.E.BASFORD et S.B.KORITZ,
Biochemistry 5 (1966) 926.
- 18 - E.E.JACOBS et D.R.SANADI,
J.Biol.Chem. 235 (1960) 531.
- 19 - A.L.LEHNINGER,
J.Biol.Chem. 234 (1959) 2187.
- 20 - J.E.RALL,R.MICHEL,J.ROCHE,O.MICHEL et S.VARRONE,
J.Biol.Chem. 238 (1963) 1848.
- 21 - T.OHNISHI et T.OHNISHI,
J.Biochem.(Tokyo) 51 (1962) 380.
- 22 - A.L.LEHNINGER,
in Horizons in Biochemistry p421,Ed. Kasha M. et
Pullman B.,Acad.Press.,New York,1962.
- 23 - G.F.KALF et M.A.GRECE,
Biochem.and Biophys.Res.Com. 40 (1970) 1488.
- 24 - R.S.CRIDDLE,R.M.BOCK,D.E.GREEN et H.TISDALE,
Biochemistry 1 (1962) 827.

- 25 - C.PAOLETTI et G.RIOU,
Bulletin du Cancer. 57 (1970) 301
- 26 - H.SWIFT, J.H.SINCLAIR, B.J.STEVENS, N.RABINOWITZ et N.GROSS,
in "Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria ". Adriatica Ed. BARI (1968) p71
- 27 - C.A.BUCK et M.M.K.NASS,
Proc.Natl.Acad.Sci. 60 (1968) 1045
- 28 - S.FUKAMACHI, B.BARTOOV, R.S.MITRA et K.B.FREEMAN,
Biochem. and Biophys.Res.Com. 40 (1970) 852
- 29 - S.COMOROSAN, A.GASPAR et D.SANDRU,
Biochem.Biophys.Acta 166 (1968) 394
- 30 - D.NEUBERT, E.OBERDISSE, M.SCHMIEDER et I.REINISCH,
Z.Physiol.Chem 348 (1967) 1709
- 31 - H.SWIFT, M.RABINOWITZ et G.GETZ
in "Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria".Adriatica Ed. BARI (1968) p3
- 32 - L.W.WHEELDON ET E.L.LEHNINGER,
Biochemistry 5 (1966) 3533
- 33 - W.NEUPERT, D.BRDICZKA et W.SEBALD,
in "Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria".Adriatica Ed. BARI (1968) p395
- 34 - D.S.BEATTIE, R.E.BASFORD et S.B.KORITZ,
Biochemistry 6 (1967) 3099
- 35 - D.S.BEATTIE,
J.Biol.Chem. 243 (1968) 4027
- 36 - B.KADENBACH,
Europ.J.Biochem. 12 (1970) 392
- 37 - R.McKAY, R.DRUYAN, G.S.GETZ et M.RABINOWITZ,
Biochem.J. 114 (1969) 455
- 38 - M.S.JONES et O.T.G.JONES,
Biochem.J. 113 (1969) 507
- 39- M.J.FLETCHER et D.R.SANADI,
Biochem.Biophys.Acta 51 (1961) 356

- 40 - D.S.BEATTIE, R.E.BASFORD et S.B.KORITZ,
J.Biol.Chem 242 (1967) 4584
- 41 - R.DRUYAN, B.DE BERNARD et M.RABINOWITZ,
J;Biol.Chem. 244 (1969) 5874
- 42 - N.J.GROSS, G.S.GETZ et M.RABINOWITZ,
J.Biol.Chem 244 (1969) 1552
- 43 - R.W.SWICK, A.K.REXROTH et J.L.STANGE,
J.Biol.Chem 243 (1968) 3581
- 44 - D.P.TSCHUDY, H.S.MARVER et A.COLLINS,
Biochem.Biophys.Res.Commun. 21 (1965) 480
- 45 - B. DE BERNARD, G.S.GETZ et M.RABINOWITZ,
Biochem.Biophys.Acta 193 (1969) 58
- 46 - G.BRUNNER et W.NEUPERT,
Febs.Letters 1 (1968) 153
- 47 - F.L.HOCH
J.Biol.Chem 241 (1966) 524
- 48 - L.SOKOLOFF
in "Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in
Mammalian Cells".A.Pietro,M.R.Lamborg et F.T.Kenney
Eds.,Proc of third Kettering Symposium,1968 p345
Academic Press,New York.
- 49 - J.R.TATA
Dans les Rapports de la X^{ème} Réunion des Endocrinolo-
gistes de Langue Française,Paris (1969) p
- 50 - J.BUCHANAN et D.F.TAPLEY,
Endocrinology 79 (1966) 81
- 51 - L.SOKOLOFF, S.KAUFMAN, P.L.CAMPBELL,C.M.FRANCIS et H.GELBOIN
J.Biol.Chem. 238 (1963) 1432
- 52 - J.BUCHANAN, M.P.PRIMACK et D.F.TAPLEY,
Endocrinology 87 (1970) 993
- 53 - M.P.PRIMACK, J.L.BUCHANAN et D.F.TAPLEY,
Endocrinology 87 (1970) 1355

- 54 - P.VOLFIN, S.S.KAPLAY et D.R.SANADI,
J.Biol.Chem. 244 (1969) 5631
- 55 - D.DOYLE et R.T.SCHIMKE,
J.Biol.Chem. 244 (1969) 5449
- 56 - A.KORNER,
Biochem.J. 74 (1960) 462
- 57 - A.KORNER
Biochem.J. 92 (1964) 449
- 58 - B.CHANCE
Science 120 (1954) 767
- 59 - B.CHANCE et G.R.WILLIAMS,
J.Biol.Chem. 217 (1955) 409 ;
- 60 - W.C.SCHNEIDER et G.H.HOGEBOOM,
J.Biol.Chem. 183 (1950) 123
- 61 - J.ROCHE, J.E.RALL, R.MICHEL, O.MICHEL et S.VARRONE,
Biochem.Biophys.Acta 56 (1962) 188
- 62 - D.S.BEATTIE,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 31 (1968) 901
- 63 - L.SZARKOWSKA et M.KLINGENBERG,
Biochem.Z. 338 (1963) 674
- 64 - G.BRUNNER et W.NEUPERT,
FEBS. Letters 1 (1968) 153
- 65 - C.C.WIDNELL et J.R.TATA,
Biochem.J. 92 (1964) 313
- 66 - R.MICHEL, R.TRUCHOT, N.AUTISSIER et B.ROSNER,
Biochem.Pharmac. 15 (1966) 1127
- 67 - C.SCHNAITMAN, V.G.ERWIN, et J.W.GREENAWALT,
J.of Cell Biol. 32 (1967) 719
- 68 - M.A.SWANSON,
J.Biol.Chem. 184 (1950) 647

- 69 - D.H.LOWRY et J.A.LOPEZ,
J.Biol.chem. 162 (1946) 421
- 70 - G.L.SOTTOCASA, B.KUYLENSTIERNA et L.ERNSTER,
J.of Cell Biol. 32 (1967) 414
- 71 - E.ERNSTER, P.SIEKEVITZ et G.E.PALADE,
J.of Cell Biol. 15 (1962) 541
- 72 - E.C.SLATER,
Proc. 5 th Intern.Congress Biochem.,Moscow,5 (1961)
p325, Pergamon Press Oxford.
- 73 - O.H.LOWRY,N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR et R.J.RANDALL,
J.Biol.Chem. 193 (1951) 265
- 74 - J.N.WILLIAMS,Jr.,
Arch.Biochem.Biophys. 107 (1964) 537
- 75 - T.L.CHAN, J.W.GREENAWALT et P.L.PEDERSEN,
J.of Cell Biol. 45 (1970) 291
- 76 - R.ESTABROOK,
dans Methods in Enzymologie, Volume X, p41
- 77 - D.E.GRIFFITHS et D.C.WHARTON,
J.Biol.Chem. 236 (1961) 1850
- 78 - R.GOLDBERGER, A.L.SMITH, H.TISDALE et R.BOMSTEIN,
J.Biol.Chem. 236 (1961) 2788
- 79 - D.E.GREEN, J.JARNEFELT et H.TISDALE,
Biochem.Biophys.Acta. 50 (1961) 527
- 80 - R.MICHEL,
dans: Rapports de la X^{ème} Réunion des Endocrinolo-
gistes de Langue Française. (1969)
Masson et Cie Ed. p59.
- 81 - R.GUSTAFSSON, J.R.TATA, O.LINDBERG et L.ERNSTER,
J. of Cell Biol. 26 (1965) 555
- 82 - J.R.BRONK et M.J.BRONK,
J.Biol.Chem 237 (1962) 897
- 83 - F.L.HOCH
Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S. 58 (1967) 506

- 84 - F.L.HOCH,
Arch.Biochem.Biophys. 124 (1968) 238
- 85 - C.D.TURNER,
dans General Endocrinology, W.B.Saunders Compagny Ed.
p220
- 86 - J.R.TATA et L.ERNSTER,
Biochem.J. 86 (1963) 408
- 87 - F.L.HOCH,
Endocrinology 77 (1965) 991
- 88 - D.BARGETON et C.KRUMM-HELLER,
Compt.Rend.Soc.Biol. 142 (1948) 899
- 89 - E.S.EVANS, L.L.ROSENBERG et M.E.SIMPSON,
Endocrinology 66 (1960) 433
- 90 - E.S.EVANS, L.L.ROSENBERG, A.B.EVANS et A.A.KONEFF,
Endocrinology 74 (1964) 770
- 91 - W.H.DAUGHADAY, G.T.PEAKE, C.A.BIRGE et I.K.MARIZ,
The Influence of Endocrine Factors on the Concentra-
tion of Growth Hormone in Rat Pituitary. Int.Symp.
Growth Horm.,Milan (1967),pp238-252 -Excerpta Medica
Amsterdam.
- 92 - F.ESCOBAR DEL REY, G.MORREALE DE ESCOBAR, T.JOLIM et
C.LOPEZ-QUIJADA,
Endocrinology 83 (1968) 41
- 93 - A.L.LEHNINGER,
The Mitochondrion, p24
Benjamin Ed., New York. (1964)
- 94 - A.SPINKS et J.H.BURN,
Br.J.Pharmac. 7 (1952) 93
- 95 - M.ZILE et H.A.LARDY,
Arch.Biochem.Biophys. 82 (1959) 411
- 96 - F.L.HOCH,
Physiol.Rev. 42 (1962) 605

- 97 - D.F.WILSON et R.D.MERZ,
Arch.Biochem.Biophys. 119 (1967) 740
- 98 - E.C.SLATER,
Intern.Congr.Biochem. 4th,Moscow, 1961, t.5,p325
- 99 - R.MICHEL et O.MICHEL,
Compt.Rend.Soc.Biol. 161 (1967) 1883
- 100 - R.MICHEL et M.LUCAS,
Compt.Rend.Soc.Biol. 162 (1968) 853
- 101 - T.HULTIN,
Exptl.Cell Res. 1 (1950) 376
- 102 - G.F.MALEY et H.A.LARDY,
J.Biol.Chem. 215 (1955) 277
- 103 - J.R.BRONK,
Science 153 (1966) 638
- 104 - L.ORELAND et T.OLIVECRONA,
Arch.Biochem.Biophys. 142 (1971) 710
- 105 - S.FLEISCHER et B.FLEISCHER,
Methods in Enzymol. 10 (1967) 406
- 106 - L.ROTHFIELD et A.FINKELSTEIN,
Ann.Rev.Biochem. 37 (1968) 463
- 107 - D.E.S.TRUMAN,
Exptl.Cell Res. 31 (1963) 313
- 108 - E.E. JACOBS et D.R.SANADI,
J.Biol.Chem. 235 (1960) 531
- 109 - D.S.BEATTIE, R.E.BASFORD et S.B.KORITZ,
J.Biol.Chem. 242(1967) 3366
- 110 - D.F.PARSONS, G.R.WILLIAMS et B.CHANCE,
Ann. N.Y.Acad.Sci. 137(1966) 643
- 111 - M.D.KAMEN
dans Isotopic Tracers in Biology p133
Ed. Academic Press Inc.New York publishers (1957)

- 112 - R.T.SCHIMKE et D.DOYLE,
Ann.Rev.Biochemistry 39 (1970) 929
- 113 - R.T.SCHIMKE, R.GANSCHOW, D.DOYLE et I.M.ARIAS,
Federation Proc. 27 (1968) 1223
- 114 - D.SHEMIN et D.RITTENBERG,
J.Biol.Chem. 166 (1946) 627
- 115 - C.V.LUSENA et F.DEPOCAS,
Can.J.Biochem. 44 (1966) 497
- 116 - R.W.SWICK, P.L.BARNSTEIN et J.L.STANGE,
J.Biol.Chem. 240 (1965) 3341
- 117 - M.S.JONES et O.T.G.JONES,
Biochem;Biophys.Res.Com. 41 (1970) 1072
- 118 - V.ASCHENBRENNER, R.DRUYAN, R.ALBIN et M.RABINOWITZ,
Biochem.J. 119 (1970) 157
- 119 - M.PASCAUD,
Biochem.Biophys.Acta 84 (1964) 528
- 120 - E.BAILEY, C.B.TAYLOR et W.BARTLEY,
Biochem.J. 104 (1967) 1026
- 121 - L.WHEELDON,
Biochem.Biophys.Res.Com. 24 (1966) 407
- 122 - A.M.KROON,
dans Regulation of Metabolic Processus in Mitochondria. p397 ,Ed. by Tager,Papa,Guagliarello, Slater,(1966).
- 123 - D.B.ROODYN, J.W.SUTTIE et T.S.WORK
Biochem.J. 85 (1962) 177
- 124 - B.R.HALDAR et K.B.FREEMAN,
Biochem.J. 111 (1969) 653
- 125 - D.S.BEATTIE,
J.Membrane Biol. 1 (1969) 383

- 126 - N.F.GONZALEZ-CADAVID et P.N.CAMPBELL,
Biochem.J. 105 (1967) 443
- 127 - C.SACCONE, M.N.GADALETA et R.GALLERANI,
Eur.J.Biochem. 60 (1969) 61
- 128 - T.De LEO, A.BARLETTA et S.Di MEO,
Life Sciences 8 (1969) 747
- 129 - J.R.TATA et C.C.WIDNELL,
Biochem.J. 98 (1966) 604
- 130 - K.SCHIMMELPFENNIG, M.SAUERBERG et D.NEUBERT,
FEBS LETTERS 10 (1970) 269
- 131 - N.J.GROSS,
J. of CELL Biol. 48 (1971) 29
- 132 - N.J.GROSS,
communication personnelle.
- 133 - G.D.SNELL,
Proc.Natl.Acad.Sci. 15 (1929) 733
- 134 - V.J.LEWIS, E.V.CHEEVER et W.P.VANDERLAAN,
Endocrinology 76 (1965) 210
- 135 - H.GRUNEBERG,
The genetics of the Mouse, p122, Martinus Nijhoff,
The Hague (1952).
- 136 - H.ELFTMAN et O.WEGELIUS,
Anat.Record. 135 (1959) 43
- 137 - P.E.SMITH et E.C.McDOWELL,
Anat.Record. 46 (1930) 249
- 138 - N.J.NADLER et C.P.LEBLOND,
dans The Thyroid, Report of Symposium Held, June 9,
(1954), p40.
- 139 - A.BARTKE;
Anat.Record. 149 (1964) 225

- 140 - R.SCHAIBLE et J.W.GOWEN,
Genetics 46 (1961) 896
- 141 - E.G.RENNELS et W.McNUTT,
Anat.Record. 131 (1958) 591
- 142 - P.E.SMITH et E.C.Mc DOWELL,
Anat.Record. 50 (1931) 85
- 143 - G.D.SNELL,
Anat.Record. 47 (1930) 316
- 144 - A.BARTKE,
Genetics 50 (1964) 234
- 145 - R.ORTMAN
J.Morphol. 99 (1956) 417
- 146 - R.R.PETERSON
Anat.Record. 133 (1959) 322
- 147 - A.Van TOL,
Biochem.Biophys.Acta. 219 (1970) 227
- 148 - R.P.DALLMAN, G.DALLNER, A.BERGSTRAND et L.ERNSTER,
J. of Cell Biol. 41 (1969) 357
- 149 - C.SCHNAITMAN et J.W.GREENAWALT,
J. of Cell Biol. 38 (1968) 158
- 150 - M.RABINOWITZ, G.S.GETZ, J.CASET et H.SWIFT,
J.Biol.Mol. 41 (1969) 381
- 151 - L.S.JEFFERSON et A.KORNER,
Biochem.J. 111 (1969) 703
- 152 - C.C.WIDNELL et J.R.TATA,
Biochem.J. 98 (1966) 621
- 153 - T.MATSUBARA et Y.TOCHINO,
J.Biochem.(Japan) 68 (1970) 731
- 154 - E.KNOBIL,
Physiologist, 9 (1966) 25

- 155 - L.S.JEFFERSON et A.KORNER,
Biochem.J. 111 (1969) 703
- 156 - C.D.JACKSON et B.H.SELLS,
Biochem.Biophys.Acta 142 (1967) 419
- 157 - A.L.GOLDBERG,
J.Biol.Chem. 244 (1969) 3217
- 158 _ N.J.GROSS,
Communication personnelle.
- 159 - S.S.KATYARE, P.FATTERPAKER et A.SREENIVASAN,
Biochem.J. 118 (1970) 111

T A B L E D E S M A T I E R E S
=====

<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u>	1
<u>OBJET DU TRAVAIL</u>	8
<u>PREMIÈRE PARTIE</u>	9
<u>Matériel et techniques générales</u>	9
I - <u>Préparation et qualités des particules subcellulaires de rats.</u>	9
1-isolement des mitochondries hépatiques	
2-isolement des mitochondries rénales	11
3-isolement des mitochondries de coeur	11
4-isolement des microsomes hépatiques et de rein	12
5-isolement des noyaux hépatiques	13
6-détermination des activités enzymatiques spécifiques des particules subcellulaires	14
a-monoamine oxydase	
b-cytochrome oxydase	15
c-glucose 6-phosphatase	17
d-NADPH-cytochrome c réductase	17
7-estimation de la contamination microsomale	18
II - <u>Préparation et qualités des particules subcellulaires de souris naines.</u>	19
1-isolement des particules	19
2-qualités des particules isolées	
III - <u>Propriétés biochimiques des mitochondries</u>	20
1-dosages des protéines	20
2-propriétés oxydophosphorylantes	20
3-dosage des cytochromes	23

DEUXIEME PARTIE

25

Oxydophosphorylations mitochondriales et biosynthèse
des particules subcellulaires chez le rat normal et
thyroïdectomisé.

- Chapitre I -

Propriétés biochimiques comparées de mitochondries de
rats normaux et hypothyroïdiens.

26

I - Propriétés oxydophosphorylantes

26

1-conditions expérimentales

27

2-résultats

27

a-mitochondries hépatiques

27

b-mitochondries rénales et cardiaques

38

II - Concentrations des cytochromes

41

III - Activité de la monoamine oxydase

43

Discussion et conclusions

46

- Chapitre II -

Influence de l'état thyroïdien sur la biosynthèse
des divers constituants protéiques subcellulaires
de rats.

49

I - Mode opératoire

50

a-préparation des animaux

b-séparation des constituants mitochondriaux

50

c-purification des protéines

51

d-isolément des membranes mitochondriales
hépatiques

53

e-mesure de la radioactivité

55

f-détermination des vitesses de renouvellement
des constituants protéiques

56

II - Résultats

57

III - Discussion et conclusions

64

TROISIEME PARTIE

71

Propriétés biochimiques des mitochondries hépatiques
et biosynthèse des constituants protéiques subcellu-
laires de la souris génétiquement naine.

I - Propriétés biochimiques comparées

73

1-propriétés oxydophosphorylantes

73

2-activités enzymatiques

73

II - Biosynthèse des composants protéiques subcel-
lulaires.

76

1-vitesses de renouvellement

78

2-cinétique d'incorporation de la ^{14}C -L-leucine

78

3-influence de STH et T_3

86

III - Discussion et conclusions

89

CONCLUSIONS GENERALES

91

BIBLIOGRAPHIE

94

TABLE DES MATIERES

106

